



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

REGINALDO LUÍS OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE FOLÍCULOS COM
UM OU MAIS OÓCITOS EM OVÁRIOS OVINOS (*Ovis aries*)**

REGINALDO LUÍS OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE FOLÍCULOS COM
UM OU MAIS OÓCITOS EM OVÁRIOS OVINOS (*Ovis aries*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48c Oliveira, Reginaldo Luís.
Comparação morfofuncional de folículos com um ou mais oócitos em ovários
ovinos (*Ovis aries*) / Reginaldo Luís Oliveira. – Londrina, 2014.
77 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, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Folículos ovarianos – Teses. 2. Ovários – Ovelha – Teses. 3. Oócitos –
Teses. 4. Reprodução animal – Teses. 5. Histologia veterinária – Teses. I. Seneda,
Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.
CDU 636.082.4

REGINALDO LUÍS OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE FOLÍCULOS COM
UM OU MAIS OÓCITOS EM OVÁRIOS OVINOS (*Ovis aries*)**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^a Ana Paula F. R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^a Wanessa Blaschi
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Londrina, 25 de Março de 2014.

Dedico este trabalho
aos meus pais Dilson e Menir,
a quem devo minha formação moral.

Ao meu avô,
Joaquim Oliveira Thasmo (*in memoriam*),

QUE PERMANECE VIVO ATRAVÉS DE MINHAS PALAVRAS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por estar presente em todos os momentos de minha vida, dando-me inspiração, determinação e perseverança para atingir meus objetivos.

Agradeço ao meu orientador, por ter acreditado em mim, pela orientação neste trabalho e sobretudo pela amizade. Além de professor, orientador e amigo, sempre esteve presente nos momentos difíceis, dando conselhos e compartilhando experiências de vida. Professor Marcelo, muito obrigado por poder contar com o senhor, pessoa que sempre tive grande estima e admiração. Obrigado pelos ensinamentos profissionais e pela amizade construída, que pretendo cultivar por longos anos! Conte sempre comigo!

Agradeço aos meus pais, Dilson e Menir, pelo amor, dedicação, fé e perseverança. Agradeço pelo exemplo de vida e determinação, pela conduta, ensinamentos e conselhos. Agradeço por acreditarem em meus sonhos, que mesmo não tendo a oportunidade de estudos que eu tive, acreditaram em mim e não mediram esforços para investir na minha formação. Agradeço a Deus todos os dias por me conceder o privilégio de levar comigo, pelo resto de minha vida, um pouco de cada um de vocês. Amo vocês!

Agradeço aos membros da banca de qualificação (Professora Dr^a. Maria Isabel Mello Martins, Dr^a. Katia Cristina Silva Santos, Dr^a. Livia Aires Lisboa) pelas importantes contribuições para este trabalho.

Agradeço a Professora Ana Paula F.R.L. Bracarense pela amizade e confiança que construímos ao longo destes anos. Agradeço pelo carinho, pelos conselhos, orientações durante a graduação, pelo exemplo que é de integridade, caráter e profissionalismo. Agradeço por disponibilizar, sem restrições, seu laboratório, materiais e equipamentos necessária para a realização deste trabalho. Sempre terá minha amizade, respeito e admiração!

Agradeço a Professora Wanessa Blaschi, por aceitar participar deste momento importante de minha carreira profissional, pelo tempo dedicado e por poder contribuir com este trabalho.

Agradeço aos meus familiares, pelo apoio e incentivo, nos momentos fáceis e difíceis, pelo carinho e momentos de alegria e descontração.

Em especial, gostaria de agradecer a amiga Elisângela, pela amizade

durante todos estes anos. Agradeço pela grande ajuda, dedicação e empenho durante toda a execução deste trabalho.

Aos amigos e colegas de profissão que contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor (Alethéia, Anne, Camila Bizarro, Camila Rosa, Eleni, Fabiana, Fábio, Fernanda, Gustavo, Jeferson, João Paulo, Katia, Luciana, Luciana Sartori, Letícia, Livia, Luiz Daniel, Maíra, Marília, Marilú, Marina, Paula, Polyana, Rebeca, Roberta, Suellen e Thiago)

Agradeço aos amigos do laboratório de Anatomia Patológica e do Laboratório de Inspeção de Leite.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta conquista.

Obrigado!

“Senhor, fazei de mim um instrumento da vossa paz!

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé;

Onde houver erro, que eu leve a verdade;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz!

Ó Mestre, fazei que eu procure mais:

Consolar, que ser consolado;

Compreender, que ser compreendido;

Amar, que ser amado;

Pois é dando que se recebe;

É perdoando que se é perdoado;

E é morrendo que se vive para a vida eterna.”

São Francisco de Assis

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

OLIVEIRA, Reginaldo Luís. **Comparação morfofuncional de folículos com um ou mais oócitos em ovários ovinos (*Ovis aries*)**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a morfologia e atividade proliferativa de folículos com um oócito e folículos com mais de um oócito (multioócitos - MOFs) em ovários de ovinos. Para tanto, foram utilizados 32 pares de ovários de ovelhas oriundas de abatedouro local. No momento da colheita, os ovários foram avaliados macroscopicamente (estimativa da população folicular antral, presença de corpos lúteos), mensurados, pesados e fixados em solução de formalina tamponada a 10%. No primeiro experimento foi realizada a avaliação das características morfológicas e morfométricas dos folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento, através da análise de lâminas histológicas coradas pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas e os folículos classificados e mensurados através de programa de análise de imagens MOTICplus®. Obteve-se os seguintes diâmetros médios para folículos e oócitos: primordiais, $30,96 \pm 4,6\mu\text{m}$ e $25,09 \pm 1,61\mu\text{m}$; primordiais multioócitos (MOFs), $48,62 \pm 5,66\mu\text{m}$ e $24,31 \pm 3,35\mu\text{m}$; primários, $50,96 \pm 8,52\mu\text{m}$ e $34,42 \pm 4,50\mu\text{m}$; secundários, $86,48 \pm 21,85\mu\text{m}$ e $49,01 \pm 11,49\mu\text{m}$; antrais, $226,26 \pm 69,93\mu\text{m}$ e $66,26 \pm 11,01\mu\text{m}$. Através do teste de Wilcoxon para amostras dependentes foi evidenciado que o diâmetro dos oócitos de MOFs primordiais comparado aos oócitos de folículos com um oócito, no mesmo estágio de desenvolvimento, não foi significativo. MOFs foram observados em maior quantidade que os folículos secundários, não havendo diferença significativa quanto à sua prevalência entre os ovários direito e esquerdo. Os dados macroscópicos foram analisados através do teste de correlação de Spearman e mostraram correlação significativa da população folicular média em relação ao diâmetro médio ovariano ($p < 0,01$), ao peso médio ovariano ($p < 0,05$) e ao volume médio ovariano ($p < 0,05$). O número total de MOFs não apresentou correlações significativas com as demais variáveis, entretanto mostrou uma correlação próxima da significância com a população média folicular ($p = 0,056$). No segundo experimento, as amostras foram processadas e submetidas à avaliação imuno-histoquímica para os anticorpos anti-PCNA e anti-Ki-67 e a análise foi realizada através de score histológico. Após verificado a ausência de normalidade e homocedasticidade os dados imuno-histoquímicos foram analisados através do teste de Wilcoxon para amostras dependentes. A imunoexpressão para PCNA foi presente em todos os estagios do desenvolvimento folicular, não apresentando diferença significativa entre os folículos contendo um oócito e MOFs primordiais. Em relação à imunoexpressão de Ki-67, não foi observado imunomarcacão positiva para os folículos com um oócito e MOFs primordiais, porém, em todos os outros estágios de desenvolvimento observou-se imunomarcacão positiva, tanto para folículos com um oócito, quanto para multioócitos. Os resultados obtidos através de avaliação morfométrica e imuno-histoquímica sugerem que folículos primordiais MOFs apresentam morfologia e atividade semelhantes aos folículos primordiais com um oócito, existindo a possibilidade de desenvolverem-se normalmente.

Palavras-chave: Folículo gênese. Folículos Pré-antrais. Imuno-histoquímica. Ki-67. PCNA.

OLIVEIRA, Reginaldo Luís. **Morphofunctional comparison of one or more follicles with oocytes in ovary sheep (*Ovis aries*)**. 2014. 77p. Dissertation (Master in Animal Science) – Londrina State University, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the morphology and proliferative activity of follicles with an oocyte and follicles with more than one oocyte (multioocytes - MOFs) in ovaries of sheep. To this end, 32 pairs of ovaries from sheep originating from a local slaughterhouse were used. At harvest, the ovaries were macroscopically evaluated (estimated antral follicular population, presence of corpora lutea), measured, weighed and fixed in formalin buffered at 10%. In the first experiment the evaluation of morphological and morphometric characteristics of ovarian follicles was performed in different stages of development, through the analysis of histological slides stained by Periodic Acid Schiff (PAS). Slides were analyzed and classified and measured follicles through image analysis MOTICplus ® program. We obtained the following average diameters follicles and oocytes: primordial, $30,96 \pm 4,6\mu\text{m}$ and $25,09 \pm 1,61\mu\text{m}$; primordial multioocytes (MOFs) $48,62 \pm 5,66\mu\text{m}$ and $24,31 \pm 3,35\mu\text{m}$; primary, $50,96 \pm 8,52\mu\text{m}$ and $34,42 \pm 4,50 \mu\text{m}$; secondary, $86,48 \pm 21,85 \mu\text{m}$ and $49,01 \pm 11,49 \mu\text{m}$; antral, $226,26 \pm 69,93\mu\text{m}$ and $66,26 \pm 11,01\mu\text{m}$. Using the Wilcoxon test for dependent samples was shown that the diameter of MOFs primordial oocytes compared to oocytes from follicles with an oocyte in the same stage of development, was not significant. MOFs were found in greater quantity than the secondary follicles, with no significant difference in prevalence between the right and left ovaries. Macroscopic data were analyzed using the Spearman correlation test showed significant correlation and average follicular population in relation to the average ovarian diameter ($p < 0,01$), the average ovarian weight ($p < 0,05$) and average ovarian volume ($p < 0,05$). The total number of MOFs showed no significant correlations with the other variables, however showed a close correlation with the significance of follicular average population ($p = 0,056$). In the second experiment, the samples were processed and subjected to immunohistochemical evaluation for anti-PCNA and anti-Ki-67 and analysis was performed by histological score. After verified the absence of normality and homoscedasticity immunohistochemical data were analyzed using the Wilcoxon test for dependent samples. The immunostaining for PCNA was present in all stages of follicular development, no significant difference between the follicles containing an oocyte and primordial MOFs. In relation to the immune Ki-67, no positive immunostaining was observed for follicles with an oocyte and primordial MOFs, but in all other stages of development observed positive immunostaining for both follicles with an oocyte, and for multioocytes. The results obtained from morphometric and immunohistochemical evaluation suggest that primordial follicles MOFs exhibit similar morphology and the primordial follicles with an oocyte activity, with the possibility to develop normally.

Keywords: Folliculogenesis. Immunohistochemistry. Ki-67. PCNA. Preantral Follicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1-** Representação dos fatores envolvidos em células germinativas primordiais (PGC) na formação, oogênese e foliculogênese. Azul - fatores ovarianos produzidos pelas células da teca; Roxo – células da granulosa; Vermelho - células germinativas; Verde – células germinativas e da granulosa. (*) fatores de transcrição20
- Figura 2-** Alterações celulares que ocorrem durante o desenvolvimento folicular.....23
- Figura 3-** Fases de transição das células da granulosa durante o crescimento folicular25
- Figura 4-** Sequências ordenadas (i-viii) dos eixos de mitoses em diferentes camadas das células da granulosa durante o desenvolvimento celular.....27
-
- Artigo 1 – Comparação das Características Morfológicas e Morfométricas entre Folículos com Um Oócito e Folículos Multioócitos em Ovários Ovinos (*Ovis aries*)**
- Figura 1-** Fotomicrografia com representação esquemática de medidas realizadas nos folículos ovarianos, a partir da média de duas perpendiculares, para o oócito (L1 e L2) e para o folículo (L3 e L4), realizadas pelo programa Motic Images Plus 2.0 ML. Barra= 50µm46
- Figura 2-** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de ovino corado em PAS. A– Folículo Primordial (seta); B– Folículo multioócito com quatro oócitos; C– Folículo Primário: oócito (O), células da granulosa (CG); D– Folículo Secundário; E– Folículo Antral: oócito (O), zona pelúcida (ZP), antro (A), células da granulosa (CG), teca interna (TI) e teca externa (TE). Barras = 50µm50

Figura 3-	Distribuição dos diâmetros médios das medidas dos folículos e seus respectivos oócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular em ovários de ovinos.	51
Artigo 2 –	Atividade Proliferativa de Folículos Multioócitos em Ovários Ovinos (<i>Ovis aries</i>)	
Figura 1-	Fotomicrografias de cortes histológicos de ovário ovino, marcados (castanho) pelo anticorpo anti-PCNA. A– Folículo primordial (seta); B – Folículo primário; C– Folículo Secundário; D– Folículo Antral; E– Folículo multioócitos contendo 3 oócitos. Barras = 50µm..	67
Figura 2-	Fotomicrografias de cortes histológicos de ovário ovino submetidos ao anticorpo anti-Ki-67. A– Folículos Primordiais com um único oócito (seta preta) e multioócitos (seta vermelha) com imunomarcações negativas; B– Folículos primário em transição com imunomarcação positiva (seta); C– Folículo secundário com imunomarcação positiva (castanho); D– Folículo Antral - imunomarcação positiva (castanho); E– Folículo Multioócito Secundário com dois oócito (asterisco) com imunomarcação positiva; EI- Detalhe folículo multioócito secundário evidenciando os dois oócitos, 100x; EII- Detalhe folículo multioócito secundário evidenciando oócitos em diferentes planos de disposição, 100x; EIII- Detalhe folículo multioócito secundário evidenciando imunomarcação positiva em célula da granulosa (seta), 100x; Barras = 50µm.....	68

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1-	Cronologia da oogênese e foliculogênese nos ovários de fetos de pequenos ruminantes.....	22
Artigo 1 –	Comparação das Características Morfológicas e Morfométricas entre Folículos com Um Oócitos e Folículos Multioócitos em Ovários Ovinos (<i>Ovis aries</i>)	
Tabela 1-	Correlação de medidas e mensurações macroscópicas dos ovários e folículos multioócitos em ovinos	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs	proteínas morfogenéticas ósseas
CG	células da granulosa
DES	dietilestilbestrol
E2	estradiol
ER α	receptores de estradiol α
ER β	receptores de estradiol β
FIV	fertilização in vitro
FSH	hormônio folículo estimulante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	inseminação artificial
IBGE	instituto brasileiro de geografia e estatística
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
Ki-67	antígeno de proliferação celular Ki-67
LH	hormônio luteinizante
MOF's	folículos multioócitos
PAS	ácido periódico de Schiff
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PGCs	células germinativas primordiais
PIVE	produção in vitro de embriões
SCP1	proteína-1 do complexo sinaptonemal
TE	transferência de embriões
TGF	fator transformador do crescimento
TPZs	projeções transzonais
VG	vesícula germinativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	O OVÁRIO.....	18
2.1.1	População Folicular Ovariana	18
2.2	OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	19
2.3	FOLÍCULO OVARIANO	23
2.3.1	Classificação e Caracterização dos Folículos Pré-Antrais (Não Cavitários).....	23
2.3.1.1	Folículos primordiais	24
2.3.1.2	Folículos intermediários e primários.....	24
2.3.1.3	Folículos secundários.....	25
2.3.2	Classificação dos Folículos Antrais (Cavitários).....	26
2.3.3	Folículos Multioócitos	28
2.4	ATRESIA FOLICULAR	31
2.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR	31
	REFERÊNCIAS	33
3	HIPÓTESE	40
4	OBJETIVOS	41
4.1	OBJETIVO GERAL	41
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	42
	ARTIGO 1: Comparação das Características Morfológicas e Morfométricas entre Folículos com Um Oócitos e Folículos Multioócitos em Ovários Ovinos (<i>Ovis aries</i>).....	42
	Resumo	43
	Introdução	44

Material e Métodos	45
Animais	45
Processamento Histológico	45
Leitura das Lâminas	45
Análise Estatística	46
Resultados	47
Análise Macroscópica	47
Análise Histológica e Morfométrica	48
Discussão	52
Referências	55

ARTIGO 2: Atividade Proliferativa de Folículos Multioócitos em Ovários Ovinos (<i>Ovis aries</i>)	60
Resumo	61
Introdução	62
Material e Métodos	63
Animais	63
Processamento Histológico	63
Morfologia dos Folículos Multioócitos.....	63
Avaliação Imuno-histoquímica.....	64
Análise Estatística	65
Resultados	66
Discussão	69
Referências	72

6 CONCLUSÕES GERAIS	77
----------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro de ovinos é composto por aproximadamente 17,7 milhões de cabeças (IBGE, 2012) e os principais mercados produtores e consumidores encontram-se predominantemente em alguns estados das regiões sul e nordeste. Nos últimos anos, a ovinocultura tem se intensificado, ocupando posição de destaque no agronegócio brasileiro, por ser uma atividade importante para a viabilidade de pequenas propriedades rurais, proporcionando alta lucratividade, boa adaptabilidade dos animais e um ciclo produtivo curto (DEMNICIS *et al.*, 2008).

A adoção de biotecnologias reprodutivas, como inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões, tem-se intensificado com o intuito de aumentar o número de animais geneticamente superiores, contribuindo assim para o aumento da produtividade e da eficiência dos rebanhos. Para a otimização destas biotécnicas, o conhecimento da fisiologia reprodutiva é essencial. A população de folículos ovarianos pré-antrais, que constituem 90% de todos os folículos ovarianos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; HASHIMOTO *et al.*, 2007), são essenciais para o conhecimento da fisiologia reprodutiva e adequada aplicação destas biotécnicas, uma vez que a reserva ovariana é estabelecida ainda na fase pré-natal e, após o nascimento, os folículos ovarianos vão sendo consumidos gradativamente durante a vida reprodutiva (EGGAN *et al.*, 2006).

Estudos relacionados à população folicular ovariana em mamíferos têm demonstrado a presença de folículos multioócitos, ou seja, folículos que apresentam dois ou mais oócitos contidos dentro de um único folículo sem uma membrana basal que os separe (TINGEN *et al.*, 2009). Várias espécies já foram descritas com estas estruturas, tais como, coelhos (AL-MUFTI *et al.*, 1988), cães (TELFER; GOSDEN, 1987; PAYAN-CARREIRA; PIRES, 2008; REYNAUD *et al.*, 2009), suínos (STANKIEWICZ *et al.*, 2009), caprinos (LUCCI *et al.*, 1999), ovinos (SANTOS *et al.*, 2006) e bovinos (LUCCI *et al.*, 2002; SILVA-SANTOS *et al.*, 2011).

Acredita-se que estes folículos sejam formados nas fases iniciais da foliculogênese e seu desenvolvimento não seja nem um espúrio nem um fenômeno patológico, mas sim um polimorfismo natural, resultante de uma gama de possíveis combinações numéricas de oócitos e células da pré-granulosa (TELFER; GOSDEN,

1987). Informações sobre as propriedades morfológicas e funcionais dos folículos multioócitos na espécie ovina são pouco esclarecidas e isto tem estimulado estudos para compreender os fatores envolvidos no desenvolvimento dessas estruturas.

O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar morfológicamente folículos multioócitos em ovários de fêmeas ovinas, além de comparar sua atividade mitótica com os demais folículos ovarianos, a fim de compreender se apresentam desenvolvimento semelhantes aos demais folículos ovarianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O OVÁRIO

Os ovários possuem uma função exócrina, para a produção do oócito ou gameta feminino, e endócrina, para produção de hormônios sexuais femininos (AUGHEY; FRYE, 2001). O seu formato e tamanho varia conforme a espécie animal e a fase do ciclo estral. Em ovinos, os ovários têm formato de amêndoa (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os ovários são constituídos por uma região cortical e outra medular. A cortical do ovário é coberta por um epitélio pavimentoso ou cuboide simples, o epitélio germinativo; logo abaixo, há a túnica albugínea, uma camada densa de tecido conjuntivo contínua ao peritônio com função de evitar aderências após a ovulação (COUTINHO *et al.*, 2013). No tecido germinativo ocorre o processo de oogênese, estando presente uma grande quantidade de folículos primordiais, primários, secundários e antrais, além de estruturas lúteas. A região medular contém tecido conjuntivo denso e frouxo, ricamente vascularizado com vasos sanguíneos e linfáticos e nervos (AUGHEY; FRYE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; COUTINHO *et al.*, 2013).

Os ovários possuem um estoques de folículos primordiais. Nos pequenos ruminantes, esses folículos são formados no segundo terço da gestação, onde uma camada de células somáticas achatadas, originárias do mesoderma, ou seja, células da pré-granulosa, envolve o oócito imaturo, com o núcleo em prófase I (COUTINHO *et al.*, 2013).

2.1.1 População Folicular Ovariana

A população folicular para ovinos ao nascimento foi estimada entre 160.000 (DRIANCOURT, 1991; FIGUEIREDO *et al.*, 2013) e 300.000 (BERTLEWSKI *et al.*, 2011), havendo uma grande variação individual. A população e distribuição dos diferentes tipos foliculares nos ovários podem ser afetados por vários fatores,

incluindo raça, grupo genético (SMITH *et al.*, 1994), idade, níveis hormonais e estado reprodutivo (ERICSON *et al.*, 1976; FIGUEIREDO *et al.*, 2013).

2.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

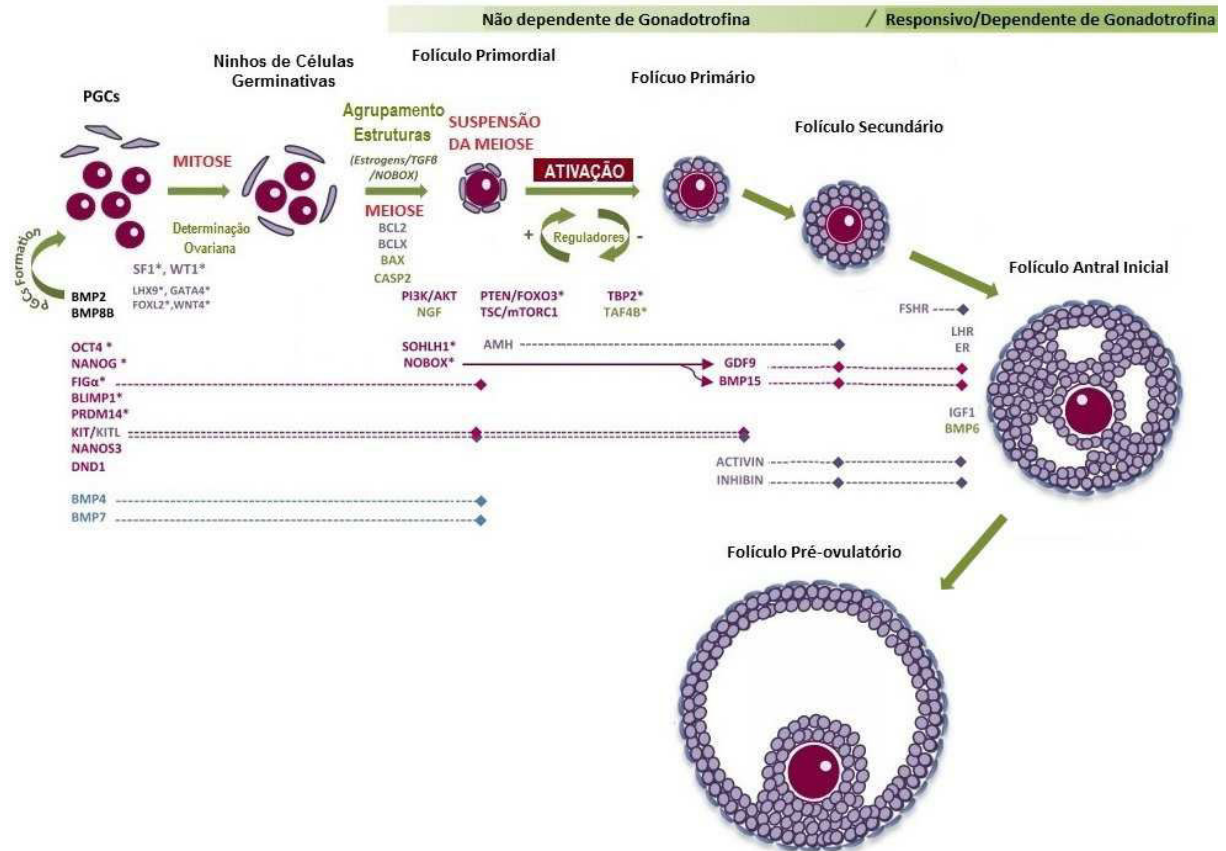
Nos ruminantes, a formação dos folículos ovarianos e dos oócitos contidos neles iniciam-se no período pré-natal. A oogênese e a foliculogênese são processos simultâneos que antecedem a ovulação e liberação do oócito maduro (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A oogênese pode ser definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (PGCs) da fêmea até a formação do oócito haploide fecundado. Antes de ser incluso no folículo ovariano, a célula oocitária é precedida da evolução de dois tipos celulares sucessivos: as células germinativas primordiais e as oogônias (FIGUEIREDO *et al.*, 2013).

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

Os membros da família do fator transformador do crescimento, tais como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) BMP4, BMP8b (origem ectoderma) e BMP2 (origem endoderma) são fatores específicos necessários para a formação e regulação da expressão do gene das células germinativas primordiais (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Cerca de três semanas após a fecundação, as PGCs surgem e migram por movimentos ameboides do epitélio do saco vitelino, através do tecido conjuntivo do intestino posterior para a crista genital (SMITZ; CORTVRINDT, 2002; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). O desenvolvimento das gônadas inicialmente bi potenciais continuarão sua diferenciação principalmente sob a influência de células somáticas derivadas de fatores de transcrição GATA4, FOXL2, LHX9, WT1, WNT4, e SF1 (Figura 1, SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Após a colonização da gônada, as PGCs multiplicam-se rapidamente e as células derivadas do mesonefro e do epitélio celomático migram para dentro da crista genital, formando cordões medulares primitivos e cordões sexuais, respectivamente. Os

cordões primitivos são colonizados por PGCs e, nos fetos do sexo feminino são chamados de oogônias (PICTON, 2001; SMITZ E CORTVRINDT, 2002; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).



Fonte: Adaptado de Sánchez; Smitz (2012).

Figura 1- Representação dos fatores envolvidos na formação das células germinativas primordiais (PGC), oogênese e foliculogênese. Azul - fatores ovarianos produzidos pelas células da teca; Roxo – células da granulosa; Vermelho - células germinativas; Verde - células germinativas e da granulosa. (*) fatores de transcrição.

As oogônias sofrerão sucessivas mitoses e posteriormente entrarão na primeira divisão meiótica (prófase I), passando a ser denominados oócitos ou ovócitos (PICTON, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2013), sendo o processo meiótico interrompido no estágio de diplóteno ou de vesícula germinativa (VG / BUCCIONE *et al.*, 1990). Quando o animal atinge a puberdade, em razão da liberação do hormônio luteinizante, a meiose é retomada, poucas horas antes da ovulação, e o núcleo oocitário entra em diacinese, iniciando-se o processo de rompimento da VG, seguido das fases de metáfase I, anáfase I e telófase I. Ocorrendo a expulsão do primeiro

corpúsculo polar, formando então o oócito secundário, com o núcleo na segunda divisão meiótica (FIGUEIREDO *et al.*, 2013). Esta fase é rápida, passando pela prófase II e metáfase II, onde ocorre a segunda interrupção da meiose. O oócito só retomará a meiose se for fecundado. Uma vez fecundado pelo espermatozoide, passará para anáfase II e telófase II, seguido da expulsão do segundo corpúsculo polar e da formação do oócito haplóide fecundado, finalizando a oogênese (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

O período da foliculogênese compreende o processo de formação, crescimento e maturação do folículo primordial até o estágio de folículo pré-ovulatório (FIGUEIREDO *et al.*, 2013).

Antes da formação folicular, o ovário fetal é colonizado por células do mesonefro, que podem se tornar fontes precursoras das células foliculares. Dentro da região medular do ovário fetal, fluxos de ramos de células somáticas do córtex circundam e invadem ninhos de oogônias e oócitos (SAWYER *et al.*, 2002). Durante este processo, os oócitos perdem suas pontes intercelulares e tornam-se inclusos em uma única camada de células achatadas ou poliédricas da pré-granulosa, derivadas do fluxo de células somáticas, formando os primeiros estágios dos folículos primordiais. As células da pré-granulosa repousam sobre uma membrana basal delicada, opostas a células do estroma, algumas das quais irão se diferenciar em camadas da teca após o início do crescimento folicular (PICTON, 2001; SAWYER *et al.*, 2002). Uma vez criada, a unidade folicular ajuda a manter o oócito em um ambiente controlado e isola a célula de substâncias potencialmente nocivas que circulam na corrente sanguínea. Qualquer oócito que não se incorporou em folículo primordial irá entrar em degeneração (PICTON, 2001).

Em pequenos ruminantes, o tempo necessário para que um folículo primordial se desenvolva até o estágio pré-ovulatório é estimado em cerca de 10 semanas. Enquanto que estima-se que o tempo necessário para um folículo crescer do estágio de folículo secundário para um folículo ovulatório maduro é de 47 dias (FIGUEIREDO *et al.*, 2013). Os oócitos que estão em repouso na prófase I da meiose saem da fase de dormência e começam a crescer, passando pelos estágios intermediários e entrando na fase pré-antral. Folículos em quiescência são frequentemente mobilizados para a fase de crescimento, o que ocorre continuamente durante os anos reprodutivos, até o esgotamento da reserva na senescência (BAERWALD, 2009).

O crescimento folicular começa com a transformação morfológica de folículos primordiais, evoluindo para folículos intermediários e primários. Estudos mais recentes têm demonstrado que os folículos primordiais e os estágios subsequentes expressam diferentes fatores de crescimento e hormônios (Figura 1), que controlam a ativação e o desenvolvimento folicular na fase pré-antral (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; BAERWALD, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2013). A cronologia da oogênese e foliculogênese no período fetal é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Cronologia da oogênese e foliculogênese nos ovários de fetos de pequenos ruminantes.

EVENTO	DIAS DE GESTAÇÃO
Formação PGCs
Diferenciação Sexual das Gônadas	31
Formação das Oogônias	43
Início da Meiose	55
Início da Separação Folicular	66
Formação de Folículos Primordiais	62
Formação de Folículos Primários	95
Formação de Folículos Secundários	103
Formação de Folículos Terciários	150
Nascimento	150

CGP: Células Germinativas Primordiais.

Fonte: Adaptado de Figueiredo *et al.*, (2013).

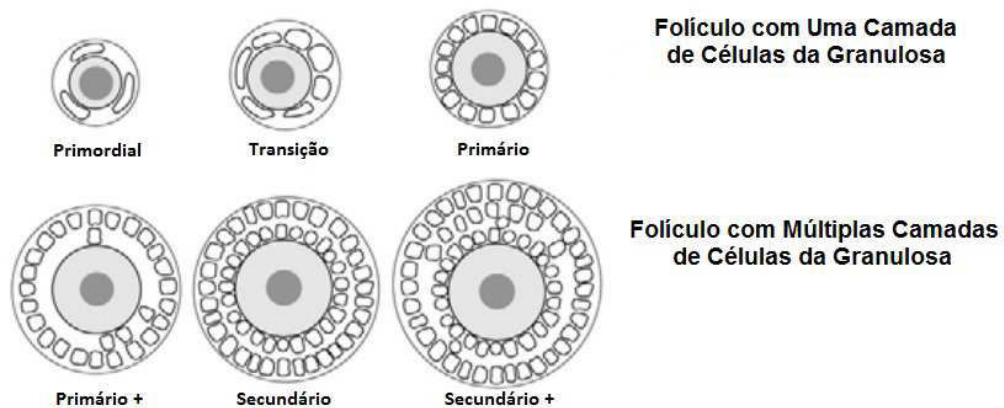
A proliferação e a diferenciação induzidas por hormônios, tanto das células pela teca quanto nas células da granulosa (CG), levam a uma habilidade crescente dos folículos para produzir estradiol (E2) e responder a gonadotrofinas. O estradiol determina qual folículo obterá um número maior de receptores para LH, necessário para a ovulação e a luteinização (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.3 FOLÍCULO OVARIANO

O folículo ovariano é a unidade estrutural e funcional do ovário, desempenhando duas funções principais: uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides) e a outra exócrina ou gametogênica, essencial para a manutenção, o crescimento e maturação de oócitos primários ou imaturos, culminando com a liberação de um oócito maduro na ovulação (FIGUEIREDO *et al.*, 2013). Nos ovinos, os folículos localizam-se no córtex ovariano, sendo classificados em folículos pré-antrais (não cavitários) e folículos antrais ou cavitários (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

2.3.1 Classificação e Caracterização dos Folículos Pré-Antrais (Não Cavitários)

Os folículos pré-antrais compõem parte dos folículos ovarianos, sendo constituídos pelos folículos primordiais, intermediários (ou de transição), primários e secundários (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus *et al.*, (2008).

Figura 2- Alterações celulares que ocorrem durante o desenvolvimento folicular.

2.3.1.1 Folículos primordiais

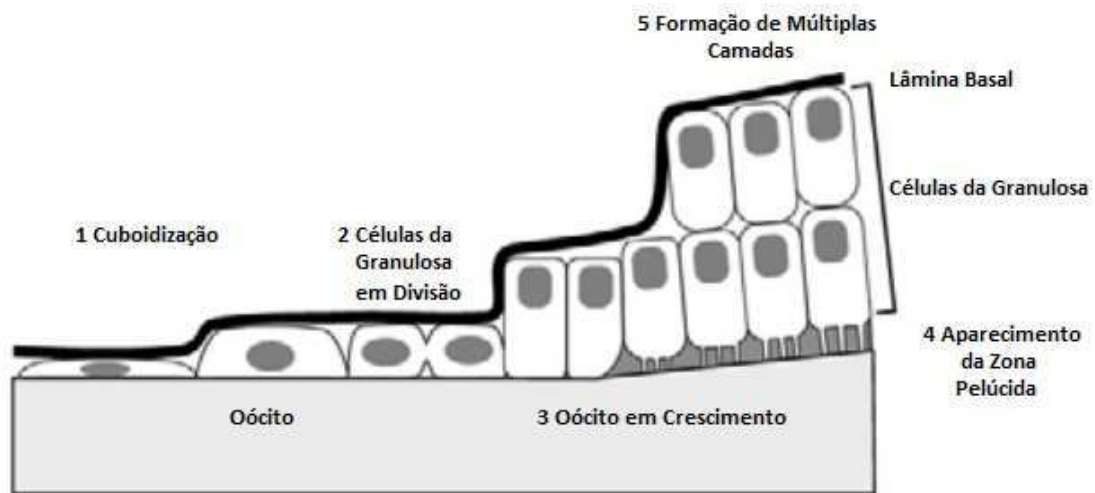
Os folículos primordiais constituem 90% de toda a população folicular presente no ovário (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Nos folículos primordiais, as células da granulosa são achatadas e estão em contato com o oócito, mediadas por junções desmossômicas (*tipo like*). As células da granulosa são envolvidas por uma lâmina basal e seus núcleos são achatados. As células dos folículos primordiais tem formato fino com extensões citoplasmáticas delgadas (SILVA-BUTTKUS *et al.*, 2008).

Os folículos primordiais estão presentes nos pequenos ruminantes por volta de 62 dias de gestação (FIGUEIREDO *et al.*, 2013). Apresentam de uma a 11 células da granulosa ao redor do oócito. O oócito possui um diâmetro que varia entre 22,8 e 52,3 μm (LUNDY *et al.*, 1999).

Nem todos os folículos primordiais permanecem em quiescência ou dormência, assim como, nem todas as células da granulosa que estão em transição entre células achatadas e células cuboides estarão em replicação celular (SILVA-BUTTKUS *et al.*, 2008).

2.3.1.2 Folículos intermediários e primários

Com crescimento dos folículos, as células da granulosa passam para o formato cuboide com o núcleo mais próximo da lâmina basal (Figura 3). Nesta fase, os folículos intermediários possuem um oócito circundado tanto por células da granulosa com formato pavimentoso quanto por células cuboides (SILVA-BUTTKUS *et al.*, 2008). Os folículos intermediários apresentam entre quatro e 18 células da granulosa; o diâmetro do oócito varia de 27,3-53 μm e o folículo mede entre 37,3 e 64 μm de diâmetro (LUNDY *et al.*, 1999).



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

Figura 3 – Fases de transição das células da granulosa durante o crescimento folicular.

Folículos primários apresentam uma única camada de células cubóides ou colunares, formando uma camada contínua e consistente entre as superfícies basais das células da granulosa e lâmina basal (Figura 8, BARTLEWSKI *et al.*, 2011). Com o desenvolvimento e amadurecimento do folículo primário, as células da granulosa passam para uma forma mais colunar e polarizada, seguindo um padrão consistente (SILVA-BUTTKUS *et al.*, 2008). Nos pequenos ruminantes, os folículos primários estão presentes ao redor de 73 e 95 dias de gestação, apresentando nesta fase entre três e 49 células da granulosa. O diâmetro dos oócitos variam de 31-80 μm e o folículo encontra-se com diâmetro variável entre 49,7 e 118,8 μm . Além disso, em 2% dos folículos primários observa-se a presença de zona pelúcida e, em 35%, a presença da teca interna (LUNDY *et al.*, 1999).

2.3.1.3 Folículos secundários

Esta fase é caracterizada pela multiplicação e surgimento de duas ou três camadas de células da granulosa cubóides (BARTLEWSKI *et al.*, 2011; Fortune, 2003). A formação da zona pelúcida começa a partir do início do crescimento dos folículos primordiais, sendo claramente visualizada em folículos secundários (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Em estádios mais avançados, observa-se o

aparecimento das células da teca, recrutadas de precursores tecais presentes no estroma ovariano. A camada de células da teca começa a se formar nos folículos em crescimento em torno da membrana basal e, finalmente, diferencia-se em teca interna e externa (RAJKOVIC *et al.*, 2006).

Durante a formação do folículo secundário, as camadas das CG são unidas por junções desmossômicas, denominadas Projeções Transzonais (TPZs). Essas TPZs são extensões contínuas de células que atravessam a zona pelúcida e terminam na superfície celular do oócito, servindo para coordenar e modelar troca de informações entre os oócitos e as células foliculares (ALBERTINI *et al.*, 2001). As projeções transzonais são numerosas, formando grandes extensões durante o período de crescimento do oócito e, após a formação do folículo antral, diminuem suas projeções e mantem um menor número de conexões terminais com o oócito, quando comparado com folículos pré-antrais (ALBERTINI *et al.*, 2001).

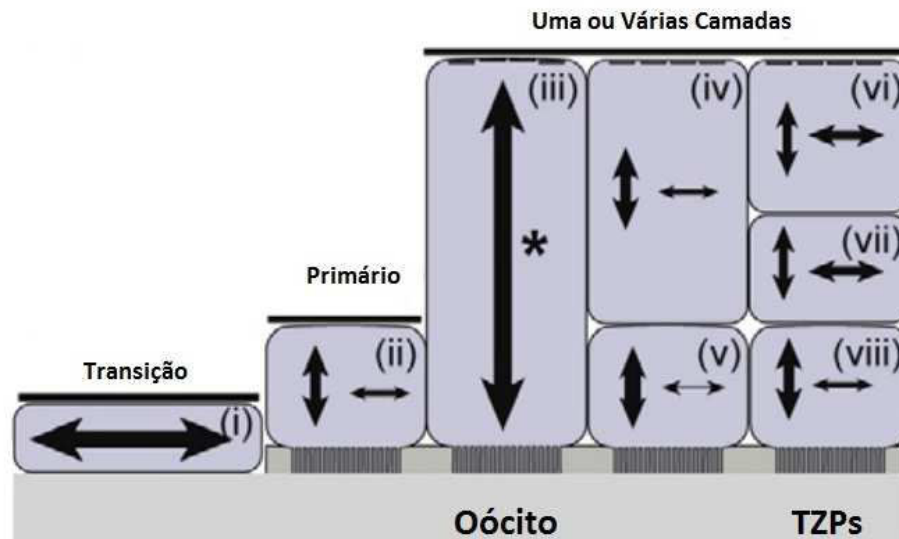
Os folículos secundários aparecem nos ovinos, em média, aos 103 dias de gestação (FIGUEIREDO *et al.*, 2013), e possuem diâmetro de 63,5-191µm e apresentam entre 19 e 152 células da granulosa ao redor do oócito. O oócito possui um diâmetro que varia entre 40,6 e 92µm. Observa-se também que a zona pelúcida está presente em 46% dos folículos e a teca interna ocorre em 100% dos secundários (LUNDY *et al.*, 1999).

2.3.2 Classificação dos Folículos Antrais (Cavitários)

No folículo primário, as células da granulosa estão em contato com a lâmina basal e com o oócito. Durante a formação dos folículos antrais, a relação entre a proliferação das células da granulosa e o crescimento do oócito mudam com o desenvolvimento da segunda camada de CG, progredindo através da adição de até seis ou sete camadas (FORTUNE, 2003). Com o início da formação das múltiplas camadas, observa-se o desenvolvimento de duas novas populações de células da granulosa, uma em contato com o oócito e a outra em contato com a lâmina basal. Posteriormente, as camadas mais internas não terão contato com nenhuma delas (SILVA-BUTTKUS *et al.*, 2008). Estas células internas, que perderam contato com a lâmina basal, se dividem mais frequentemente, devido a perdas de contato físico e de sinalização de restrições impostas pelo contato com essa matriz extracelular. Após o desenvolvimento da segunda camada de células da

granulosa, a maioria dessas células apresentam mitoses orientadas perpendicularmente à lâmina basal (SILVA-BUTTKUS *et al.*, 2008).

Através do esquema ilustrado na figura 4, observam-se os eixos de mitoses em diferentes camadas das CG nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular.



Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus *et al.*, (2008)

Figura 4 – Sequências ordenadas (i-viii) dos eixos de mitoses em diferentes camadas das células da granulosa durante o desenvolvimento celular.

No folículo antral, o oócito atinge seu diâmetro máximo e está cercado por várias camadas de células da granulosa que contêm áreas dispersas de líquido intersticial (RAJKOVIC *et al.*, 2006; BARTLEWSKI *et al.*, 2011). As células da teca começam a se diferenciar e formam várias cavidades cheias de líquido que se aglutinam para formar o líquido da cavidade antral (FORTUNE, 2003; RAJKOVIC *et al.*, 2006; BARTLEWSKI *et al.*, 2011). A produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e da permeabilidade dos vasos sanguíneos. O fluido antral pode servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras ou moduladoras derivados do sangue ou secreções das células foliculares, por exemplo, gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanas e lipoproteínas (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

A somatória destes eventos dividem as células da granulosa em duas populações: as células murais e as células do cumulus. As células da granulosa que rodeiam o oócito são chamadas de células da granulosa do cumulus, enquanto as

células que revestem a membrana basal são chamadas de células da granulosa mural. O cumulus e as células da granulosa mural não diferem apenas em sua localização, mas também na sua expressão para diferentes marcadores moleculares (RAJKOVIC *et al.*, 2006).

O início da formação de antro nos ovinos ocorre quando os folículos atingem o tamanho de 250 μ m (FORTUNE, 2003) ao redor de 150 dias de gestação (FIGUEIREDO *et al.*, 2013). Os folículos antrais ainda possuem um oócito imaturo, sendo que na maioria das espécies, somente o folículo pré-ovulatório ou de Graaf contém um oócito maturado (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Diferente dos estágios anteriores, a zona pelúcida e a teca interna estão presentes em 100% dos folículos antrais. Apresentam entre 199 e 1128 células da granulosa, dispostas em cinco ou mais camadas ao redor do oócito. O folículo mede entre 191,5-450 μ m de diâmetro e o oócito possui um diâmetro que varia entre 90,9 e 141,6 μ m (LUNDY *et al.*, 1999).

2.3.3 Folículos Multioócitos

Os folículos ovarianos dos mamíferos, geralmente, contêm um único oócito, embora, diversos autores chamem a atenção aos casos em que folículos apresentam dois ou mais oócitos (folículos multioócitos - MOFs), que estão contidos dentro de um único folículo sem uma membrana basal que os separe (TINGEN *et al.*, 2009). Estas estruturas já foram descritas em várias espécies de mamíferos, dentre elas, ratos (HA JR, 1962; GRAHAM; BRADLEY, 1971; IGUCHI *et al.*, 1988; IGUCHI *et al.*, 1990; BALCIUNIENE *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2009a; KIM, H. *et al.*, 2009b; ALM, *et al.*, 2010), coelhos (AL-MUFTI *et al.*, 1988), gatos (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; MICLAUS *et al.*, 2007), cães (TELFER; GOSDEN, 1987; McDOUGALL *et al.*, 1997; PAYAN-CARREIRA; PIRES, 2008; REYNAUD *et al.*, 2009; REYNAUD *et al.*, 2010; LUNARDON, 2013), suínos (STANKIEWICZ *et al.*, 2009), caprinos (LUCCI *et al.*, 1999), ovinos (SANTOS *et al.*, 2006), bovinos (LUCCI *et al.*, 2002; IRELAND *et al.*, 2008; YANG; FORTUNE, 2008; SILVA-SANTOS *et al.*, 2011; SILVA-SANTOS *et al.*, 2014), macacos (JEFFERSON, *et al.*, 2010) e humanos (SMITZ; CORTVRINDT, 2002). Kennedy (1924) foi um dos primeiros a descrever a ocorrência de folículos multioócitos em diferentes espécies animais, relatando até cinco oócitos em folículos multioócitos de cadelas e gatas; em coelhas três oócitos;

em cobaias, dois oócitos; em aves (galinha) encontrou somente um folículo com dois oócitos.

Telfer e Gosden (1987) avaliaram 15 diferentes espécies de mamíferos (*Isoodon macrourus*, *Sorex araneus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Mus musculus*, *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus agrestis*, *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Felis catus*, *Canis familiaris*, *Ovis aries*, *Callithrix jacchus*, *Macaca mulata*, *Homo sapiens*), e verificaram a incidência de folículos com apenas um oócito foi predominante nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular. Em 10 das 15 espécies estudadas não foram encontrados folículos multioócitos. Nas outras cinco espécies que apresentaram folículos multioócitos, a incidência variou entre 1% na coelha e 14% na cadela; já no ovário humano, 3% dos folículos continham dois ou três oócitos.

Apesar destes folículos frequentemente terem sido considerados como entidades patológicas, seu desenvolvimento não é nem um espúrio nem um fenômeno patológico, mas sim um polimorfismo natural, resultante de um espectro de possíveis combinações numéricas de oócitos e células da pré-granulosa (TELFER; GOSDEN, 1987). A origem dos folículos multioócitos é desconhecida, embora tenha sido proposto que eles derivem de uma falha na separação das células germinativas durante o início das fases da foliculogênese ou do rápido desenvolvimento das células germinativas quando comparadas à diferenciação das células somáticas que circundam os oócitos, resultando na inclusão de várias células germinativas dentro de um folículo (TELFER; GOSDEN, 1987 ; BALCIUNIENE *et al.*, 2006; BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006), ou da incapacidade de repartição das células germinativas durante as fases iniciais da foliculogênese (TINGEN *et al.*, 2009).

Acredita-se que a proteína-1 do complexo sinaptonemal (SCP1) é expressa apenas em oócitos e diminui rapidamente 24 horas após o nascimento, quando se inicia a quebra das células germinativas em ratos, levando os oócitos a iniciarem prematuramente o estágio de diplóteno da meiose e ruptura das células germinativas, causando aceleração na montagem do folículo primordial. Assim, a progressão da meiose não é meramente concomitante com quebra de células germinativas, mas causador da mesma (SILVA-SANTOS; SENEDA, 2011). O início da decomposição de células germinativas e diferenciação precoce do oócito também é afetado por outras proteínas como o fator transformador do crescimento (TGF) e

ativina. Fêmeas deficientes de ativina têm desenvolvimento ovariano anormal e desenvolvem folículos multioócitos (BRISTOL-GOULD *et al.*, 2005; SILVA-SANTOS; SENEDA, 2011).

Hormônios como estradiol, progesterona e outros compostos estrogênicos como genisteína, um fitoestrógeno, e dietilestilbestrol (DES), um estrogênio sintético, podem inibir a degradação dos ninhos de células germinativas e induzir à formação de folículos multioócitos (IGUCHI *et al.*, 1988; SILVA-SANTOS; SENEDA, 2011). A genisteína atrasa o colapso das células germinativas e reduz a morte de oócitos através da supressão da apoptose, apoiando a ideia de que os folículos multioócitos são células germinativas que não se romperam (SILVA-SANTOS; SENEDA, 2011). Em camundongos neonatos tratados com DES, houve a indução de folículos multioócitos em ovários de 5, 7 e 10 dias de idade e atraso do desenvolvimento folicular em camundongos linhagem C57BL e WT, entretanto, o mesmo não ocorreu em camundongos linhagem β ERKO. O dietilestilbestrol afeta a formação do folículo e suprime o desenvolvimento folicular via receptores de estradiol α (ER α), mas não em receptores de estradiol β (ER β). Estes resultados sugerem que o DES suprime a formação de folículos primordiais e sua progressão de primordiais para primários, principalmente em ovários de camundongos com cinco dias de idade (KIM *et al.*, 2009a).

A prevalência dos folículos multioócitos é maior em animais jovens (TELFER; GOSDEN, 1987; PAYAN-CARREIRA; PIRES, 2008). A menor frequência de folículos multioócitos em animais mais velhos sugere que o ambiente ovariano seja menos capaz de prover suporte fisiológico para o crescimento dos folículos e isso pode ser justificado pela maior escassez folicular conforme o avanço da idade (TELFER; GOSDEN, 1987).

A frequência de folículos multioócitos é extremamente variada entre as espécies e dentro da mesma espécie, podendo variar entre os indivíduos. Em estudos realizados por Payan-Carreira e Pires (2008), a frequência de folículos multioócitos em cadelas jovens foi de 62,2%; já em animais adultos, a presença de multioócitos reduz para 30,4% e animais com idade superior a 10 anos, esse valor diminuiu para 14,3%. Para cadelas na fase pré-LH, a prevalência de folículos multioócitos foi de 65% e na fase pós-LH 40%, não havendo diferenças entre a presença de folículos multioócitos e a idade das cadelas nas fases pré e pós-LH (REYNAUD *et al.*, 2009).

2.4 ATRESIA FOLICULAR

Os folículos efetivamente utilizados durante a vida reprodutiva são aqueles presentes por ocasião do nascimento do animal (SOTO-SUAZO E ZORN, 2005; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). A partir da maturidade sexual, os folículos ovarianos podem seguir dois caminhos: ovulação ou atresia. A grande maioria dos folículos não chega à ovulação, sendo eliminados por meio da atresia folicular. Existem dois tipos de atresia: a atresia de folículos pré-antrais e antrais. Na atresia de folículos pré-antrais, as alterações degenerativas ocorrem primariamente no oócito. Já a atresia de folículos antrais, as primeiras alterações ocorrem nas células da granulosa (HSUEH *et al.*, 1994). A atresia folicular é um processo fisiológico que pode ocorrer por degeneração ou por um processo de morte celular programada, denominado apoptose (HSUEH *et al.*, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 2013).

A duração da atresia é desconhecida, podendo ocorrer em qualquer momento do desenvolvimento folicular, até mesmo na fase pré-antral. Dessa forma, há redução significativa no número de oócitos potencialmente ovuláveis à medida que a reserva de folículos pré-antrais vai sendo gradativamente consumida (EGGAN *et al.*, 2006).

2.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os biomarcadores são agrupados em várias classes e podem ser utilizados para caracterizar diferentes aspectos do desenvolvimento celular. Prognósticos clínicos associados a marcadores de proliferação em neoplasias contribuem para tomadas de decisões clínicas e terapêuticas precoces (GAYED *et al.*, 2013). Aceita-se que o aumento da proliferação está associado a lesões em estágios avançados e a distribuição das células em proliferação nos tecidos possam esclarecer os mecanismo que regulam as múltiplas etapas da carcinogênese (LIU; KLEIN-SZANTO, 2000).

Os anticorpos para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e proteína Ki-67 são amplamente utilizados como indicadores de atividade celular. O PCNA é uma proteína não-histônica de 36-kDa, evolutivamente bem conservada e encontrada em todas as espécies eucarióticas (STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011), desempenhando um papel importante no metabolismo de ácido nucleico como um

componente da maquinaria de replicação e reparação. É atuante no processo da DNA polimerase δ , fator necessário para a síntese de DNA durante a replicação, também está associado com a remodelação da cromatina, o reparo do DNA, a coesão de cromátides irmãs e controle do ciclo celular. Durante a divisão celular (MYOUNG *et al.*, 2006; STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011), apresenta uma expressão mais elevada no núcleo durante a fase tardia de G1, aumentando durante a fase S, e diminui durante a fase G2 e M (IATROPOULOS; WILLIAMS, 1996; MEER *et al.*, 2003; MYOUNG *et al.*, 2006). Além disso, a meia-vida longo desta proteína (cerca de 20 horas) resulta em uma imunexpressão de células que possivelmente já tenham deixado o ciclo de divisão celular (LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; MEER *et al.*, 2003; MYOUNG *et al.*, 2006).

Já o antígeno Ki-67 é uma grande proteína não-histônica de aproximadamente 395-kD, sendo um marcador mais específico de células em proliferação, inicialmente expressa na metade de G1, aumentando os níveis de expressão na fase S e G2, atingindo seu pico em M, sendo rapidamente degradada após a mitose e ausente nas células que não estão em proliferação (fase G0) (KLEIN-SZANTO, 2000; MYOUNG *et al.*, 2006; LIU; GONG *et al.*, 2009). Sua meia-vida é estimada em 60 a 90 minutos (BROWN; GATTER, 2002; MEER *et al.*, 2003) e parece que a quantidade de proteína Ki-67 presente em momentos do ciclo celular é altamente regulado por sistemas de síntese e degradações precisos, envolvendo um complexo de proteases para uma rápida degradação da mesma (BROWN; GATTER, 2002).

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

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.H.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647–653, 2001.
- ALM, H.; KUHLMANN, S.; LANGHAMMER, M.; TUCHSCHERER, A.; TORNER, H.; REINSCH, N. Occurrence of polyovular follicles in mouse lines selected for high fecundity. **Journal of Reproduction and Development**, v.56 n.4, p.449-53, 2010.
- AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÉS, J. Ph. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.82, p.15-25, 1988.
- AUGHEY, E.; FRYE, F.L. **Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates**. UK: Manson Publishing Ltd, 2001.
- BAERWALD, A.R. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. **Animal Reproduction**, v.6, n.1, p.20-29, 2009.
- BALCIUNIENE, J.; BARDWELL, V.J.; ZARKOWER, D. Mice Mutant in the DM Domain Gene *Dmrt4* Are Viable and Fertile but Have Polyovular Follicles. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 23, p.8984–8991, 2006.
- BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.259–268, 2011.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.165–171, 1997.
- BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v.40, p. 2-11, 2002.
- BRISTOL-GOULD, S.K.; HUTTEN, C.G.; STURGIS, C.; KILEN, S.M.; MAYO, K.E.; WOODRUFF, T.K. The development of a mouse model of ovarian endosalpingiosis. **Endocrinology**, v.146, p.5228-5236, 2005.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*felis catus*). **Theriogenology**, v.66, n.1, p.5–13, 2006.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p. 543-547, 1990.

COUTINHO, L.N.; OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; BARROS, F.F.P.C. Anatomia do Sistema Reprodutor Feminino. In: OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**, 1ª ed., São Paulo: MedVet, 2013. p. 330.

DEMINICIS, B.B; LIMA, L.C.O; ARAÚJO, S.A.C; LUNGA, L; BLUME; M.C. Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. **PUBVET**, v.2, p.1-19, 2008.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.

EGGAN, K., JURGA, S., GOSDEN, R., MIN, I.M., WAGERS, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. **Nature**, v.441, p.1109-1114, 2006.

ERICKSON, B.H.; REYNOLDS, R.A.; MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v.15 n.4, p.555-560, 1976.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importance of the biotechnique of MOEPF for the study of folliculogenesis and in vitro embryo production in large scale. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.143–152, 2007.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª ed., São Paulo: Roca, 2008.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SANTOS, R.R. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais: MOIFOPA. In: OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos**, 1ª ed., São Paulo: MedVet, 2013. p. 330.

FORTUNE, J.E.; KITO, S.; WANDJI, A.S.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.441–449, 1998.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135–163, 2003.

GAYED, B.A.; YOUSSEF, R.F.; BAGRODIA, A.; DARWISH, O.M.; KAPUR, P.; SAGALOWSKY, A.; LOTAN, Y.; MARGULIS, V. Ki67 is an independent predictor of oncological outcomes in patients with localized clear-cell renal cell carcinoma. **BJU International**, doi:10.1111/bju.12263, p.1-7, 2013.

GONG, Y.; WANG, L.; WANG, H.; LI, T.; CHEN, X. The expression of NF- κ B, Ki-67 and MMP-9 in CCOT, DGCT and GCOC. **Oral Oncology**, v.45, p.515–520, 2009.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163 p.33–41, 2000.

GRAHAM, C.E.; BRADLEY, C.F. Polyovular follicles in squirrel monkeys after prolonged diethylstilboestrol treatment. . **Journals of Reproduction & Fertility**, v.27, p.181-185, 1971.

HA JR, K. Polyovular follicles and multinucleate ova in the ovaries of young rats. **The Anatomical Record**, v.142, p.25-29, 1962.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, Maturação Ovocitária e Ovulação. In: **Reprodução Animal**. 7ª ed., Barueri: Manole, 2004. p.513.

HASHIMOTO, S.; OHSUMI, K.; TSUJI, Y.; HARAUMA, N.; MIYATA, Y.; FUKUDA, A.; HOSOI, Y.; IRITANI, A.; MORIMOTO, Y. Growing porcine oocyte-granulosa cell complexes acquired meiotic competence during in vitro culture. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.2, p.379–384, 2007.

HSUEH, A.J.W.; BILING, H; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, v.15, p.707-724, 1994.

IATROPOULOS, M.J.; WILLIAMS, G.M. Proliferation markers. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.48, p.175-181, 1996.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário estatístico do Brasil, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:<
http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb_2012.pdf> Acesso em: 04 de fevereiro 2014.

IGUCHI, T.; TODOROKI, R.; TAKASUGI, N.; PETROW, V. The effects of an aromatase inhibitor and a 5 α -reductase inhibitor upon the occurrence of polyovular follicles, persistent anovulation, and permanent vaginal stratification in mice treated neonatally with testosterone. **Biology of Reproduction**, v.39, p.689-697, 1988.

IGUCHI, T.; FUKAZAWA, Y.; UESUGI, Y.; TAKASUGI, N. Polyovular Follicles in Mouse Ovaries Exposed Neonatally to Diethylstilbestrol in Vivo and in Vitro. **Biology of Reproduction**, v.43, p.478-484, 1990.

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, n.79, p.1219-1225, 2008.

JEFFERSON, W.N.; COUSE, J.F.; PADILLA-BANKS, E.; KORACH, K.S.; NEWBOLD, R.R. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for estrogen-mediated and nonestrogenic actions. **Reproductive Toxicology**, v.30, p.550–557, 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: **Histologia Básica**. 11^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.528.

KENNEDY, W.P. The occurrence of polyovular graafian follicles. **Journal of Anatomy**, v.58, n.4, p.328-334, 1924.

KIM, H.; HAYASHI, S.; CHAMBON, P.; WATANABE, H.; IGUCHI, T.; SATO, T. Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice. **Reproductive Toxicology**, v.27, p.55–62, 2009a.

KIM, H.; NAKAJIMA, T.; HAYASHI, S.; CHAMBON, P.; WATANABE, H.; IGUCHI, T.; SATO, T. Effects of Diethylstilbestrol on Programmed Oocyte Death and Induction of Polyovular Follicles in Neonatal Mouse Ovaries. **Biology of Reproduction**, v.81 n.5, p.1002-1009, 2009b.

LIU, S.C.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**, v.36, p.145-151, 2000.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÃO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v.56, p.223–236, 1999.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, n.57, p.1467-1483, 2002.

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

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N.L.; McNATTY, K.P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.251-262, 1999.

McDOUGALL, K.; HAY, M.A.; GOODROWE, K.L.; GARTLEY, C.J.; KING, W.A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, n.51, p.25-31, 1997.

MEER, S.; GALPIN, J.S.; ALTINI, M.; COLEMAN, H. AND ALI, H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.95, p.213-221, 2003.

MICLAUS V.; GROZA, I.; OANA, L. Domestic cat (*Felis catus*) polyovular follicles. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca**, v.64, p.1-2, 2007.

MYOUNG, H.; KIM, M.J.; LEE, J.H.; OK, Y.J.; PAENG, J.Y.; YUN, P.Y. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, p. 1005–1010, 2006.

OKTAY, K.; SCHENKEN, R.S.; NELSON, J.F. Proliferating Cell Nuclear Antigen Marks the Initiation of Follicular Growth in the Rat. **Biology of Reproduction**, v.53, p.295-301, 1995.

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

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, p.1193-1210, 2001.

RAJKOVIC, A.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M. M. Follicular development: mouse, sheep, and human models. In: Neill, J.D. Knobil and Neill's. **Physiology of Reproduction**, 3th ed., St. Louis: Academic Press, 2006.

REYNAUD, K.; VIARIS, D.E.; LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**, v.72, p.1120–1131, 2009.

REYNAUD, K.; HALTER, S.; TAHIR, Z.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. Les follicules polyovocytaires. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.38, p.395–397, 2010.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** **1822**, p.1896–1912, 2012.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, S.H.; SILVA, J.R.; MATOS, M.H.; LUCCI, C.M.; BAO, S.N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249–263, 2006.

SAWYER, H.R.; SMITH, P.; HEATH, D.A.; JUENGEL, J.L.; WAKEFIELD, S.J.; MCNATTY, K.P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v.66, n.4, p.1134-1150, 2002.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1691–1704, 2004.

SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G.S.; MORA, J.M.; MOBBERLEY, M.; RYDER, T.A.; BAITHUN, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v.121, p.3890-3900, 2008.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, p.1051–1057, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.; SENEDA, M.M. Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries. **Animal Reproduction**, v.8, n.3/4, p.58-67, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.; SILOTO, L.S.; SANTOS, G.M.G; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T.N.; SENEDA, M.M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.48–51, 2014.

SMITH, P.; BRAW-TAL, R.; CORRIGAN, K.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; MCNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuses that are homozygous carriers or non-carriers of the *FecB* gene. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.100, n.2, p.485-90, 1994.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v.123, p.185–202, 2002.

SOTO-SUAZO, M., ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction Science**, v.3, p.147-160, 2005.

STANKIEWICZ, T.; BLASZCZYK, B.; UDALA, J. A Study on the Occurrence of Polyovular Follicles in Porcine Ovaries with Particular Reference to Intrafollicular Hormone Concentrations, Quality of Oocytes and their in vitro Fertilization. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.38, p.233–239, 2009.

STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**, v.107, p. 1127–1140, 2011.

TELFER, E.; GOSDEN, R.G. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). **Journals of Reproduction & Fertility**, v.81, p.137–147, 1987.

TINGEN, C.; KIM, A.; WOODRUFF, T.K. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.12, p.795–803, 2009.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717–1751, 2005.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v.78, p.1153-1161, 2008.

3 HIPÓTESE

As diferenças morfológicas e morfométricas entre os folículos com um oócito e folículos multioócitos não interferem nos estágios de desenvolvimento folicular e os folículos multioócitos apresentam atividade proliferativa semelhante a de folículos contendo um oócito.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a morfologia e atividade de folículos com um oócito e folículos multioócitos em fêmeas ovinas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente e morfometricamente as principais diferenças entre folículos ovarianos com um oócito e folículos multioócitos;
- Correlacionar características macroscópicas com a presença de folículos multioócitos em ovários ovinos;
- Determinar a frequência dos folículos multioócitos em ovários de fêmeas ovinas;
- Avaliar a atividade proliferativa, através de métodos imuno-histoquímicos, de folículos com um oócito e folículos multioócitos em diferentes estágios de desenvolvimento.

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1

**“Comparação das Características Morfológicas e Morfométricas entre
Folículos com Um Oócito e Folículos Multioócitos em Ovários
Ovinos (*Ovis aries*)”**

Comparação das Características Morfológicas e Morfométricas entre Folículos com Um Oócito e Folículos Multioócitos em Ovários Ovinos (*Ovis aries*)

Resumo

A investigação das características morfológicas da população de folículos pré-antrais, principal fonte de gametas femininos, é de fundamental importância para a compreensão de processos fisiológicos como a foliculogênese e o emprego de novas estratégias reprodutivas. O objetivo deste estudo foi caracterizar morfolologicamente o contingente populacional de folículos com um oócito e folículos multioócitos da reserva ovariana de fêmeas ovinas adultas. Ovários ovinos (n=32) foram processados histologicamente e analisados em microscopia de luz. Os folículos e oócitos apresentaram os seguintes diâmetros médios: (primordiais com um oócito) $30,96 \pm 4,6\mu\text{m}$ e $25,09 \pm 1,61\mu\text{m}$; (primordiais multioócitos) $48,62 \pm 5,66\mu\text{m}$ e $24,31 \pm 3,35\mu\text{m}$; (primários) $50,96 \pm 8,52\mu\text{m}$ e $34,42 \pm 4,50\mu\text{m}$; (secundários) $86,48 \pm 21,85\mu\text{m}$ e $49,01 \pm 11,49\mu\text{m}$; (antrais) $226,26 \pm 69,93\mu\text{m}$ e $66,26 \pm 11,01\mu\text{m}$. Através do teste de Wilcoxon para amostras dependentes foi evidenciado que o diâmetro dos oócitos de folículos multioócitos primordiais comparado aos oócitos de folículos com um oócito, no mesmo estágio de desenvolvimento, não foi significativo. Os folículos multioócitos foram observados em maior quantidade que os folículos secundários e a prevalência nos ovários direito e esquerdo foi semelhante ($p=0,792$). Quanto à análise macroscópica, os dados foram submetidos ao teste de correlação de Spearman e mostraram correlação significativa da população folicular média em relação ao diâmetro médio ovariano ($p<0,01$), ao peso médio ovariano ($p<0,05$) e ao volume médio ovariano ($p<0,05$). O número total de folículos multioócitos não apresentou correlações significativas com as demais variáveis, entretanto mostrou uma correlação próxima da significância com a população média folicular ($p=0,056$). Os resultados obtidos sugerem que folículos primordiais multioócitos apresentam morfologia e desenvolvimento semelhantes aos folículos primordiais com um oócito.

Palavras-chave: Foliculogênese. Folículos Multioócitos. Folículos Pré-antrais. População Folicular.

Introdução

A ovinocultura brasileira possui potencial produtivo promissor e está em franca expansão. Para que a crescente demanda do mercado seja atendida, faz-se necessário a adoção de estratégias reprodutivas práticas, viáveis e lucrativas, visando aumentar os índices produtivos em concomitância com o progresso genético (MORAES *et al.*, 2007). Esta atividade tem ocupado cada vez mais posição de destaque no agronegócio brasileiro, principalmente por viabilizar as pequenas propriedades rurais, devido à alta lucratividade, boa adaptabilidade dos animais e a um ciclo produtivo curto (DEMINICIS *et al.*, 2008).

A adoção de biotecnologias reprodutivas, como inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões tem-se intensificado para aumentar o número de animais geneticamente superiores, contribuindo para o aumento da produtividade e eficiência em métodos de reprodução assistida. A foliculogênese em ovinos é pouco estudada e investigações quanto às características morfológicas da população de folículos pré-antrais, que constituem 90 % de todos os folículos ovarianos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007), são essenciais para o conhecimento da fisiologia reprodutiva e adequada aplicação destas biotécnicas.

Estudos relacionados a população folicular ovariana em mamíferos tem demonstrado a presença de folículos multioócitos, ou seja, folículos que apresentam dois ou mais oócitos que estão contidos dentro de um único folículo sem uma membrana basal que os separe (TINGEN *et al.*, 2009). Várias espécies já foram descritas com estas estruturas, tais como, coelhos (AL-MUFTI *et al.*, 1988), cães (PAYAN-CARREIRA; PIRES, 2008;), suínos (STANKIEWICZ *et al.*, 2009), caprinos (LUCCI *et al.*, 1999), ovinos (SANTOS *et al.*, 2006) e bovinos (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). Informações sobre as propriedades morfológicas e funcionais dos folículos multioócitos na espécie ovina são pouco esclarecidas e isto tem estimulado estudos para compreender os fatores envolvidos no desenvolvimento dessas estruturas.

O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar morfológicamente folículos com um oócito e multioócitos em ovários de fêmeas ovinas.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ovários de ovinos, da raça Santa Inês (n=32) com idade média de 36 meses, obtidos em abatedouro do município de Umuarama-PR. Imediatamente após a obtenção dos ovários, os mesmos foram lavados em álcool 70% e submetidos a dois enxágues em solução salina 0,9%. Na sequência, os ovários foram externamente avaliados quanto a quantidade de folículos maiores que dois milímetros de diâmetro (mensuração através de régua milimétrica) e presença de corpos lúteos, mensurados e pesados em balança analítica (Bel[®], Monza - Itália).

Processamento Histológico

Para analisar a morfologia ovariana, os ovários foram seccionados longitudinalmente em duas metades (hemi-ovários) e imersos em solução de formalina tamponada a 10% para processamento histológico por 24 horas para fixação, posteriormente mantidos em álcool 70%. Na sequência, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e incluídos em blocos de parafina para cortes histológicos. Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo (Leica[®], Wetzlar) em cortes seriados de 5µm de espessura. A cada intervalo de 50 secções histológicas (espessura estabelecida para evitar repetição dos mesmos folículos primordiais nas lâminas seguintes) foram montadas quatro lâminas subsequentes (réplicas) e posteriormente coradas pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS).

Leitura das Lâminas

As lâminas foram examinadas em um microscópio Leica[®] (DMSL, Leica Microsystems, Alemanha) e as imagens capturadas por uma câmera digital MOTICAM 2500 (5.0 MPixel) e analisadas no programa Motic Images Plus 2.0 ML. Os folículos foram classificados conforme o estágio de desenvolvimento, considerando-se o formato das células da granulosa (CG), o número e a quantidade de camadas de células da granulosa, como se segue: primordial, oócito envolto por

uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso; primário, com uma camada completa de células da granulosa cuboides, secundário, com duas camadas completas de CGs cuboides, antral, com três ou mais camadas de células da granulosa cuboides ao redor do oócito e presença do antro (SILVA-BUTTKUS *et al.*, 2008).

As medidas dos folículos e oócitos foram realizadas conforme as citadas por Silva-Buttkus *et al.* (2008), sendo que o diâmetro oocitário e folicular foi calculado a partir da média aritmética de duas medidas perpendiculares, usando o programa Motic Plus 2.0 (Figura 1).

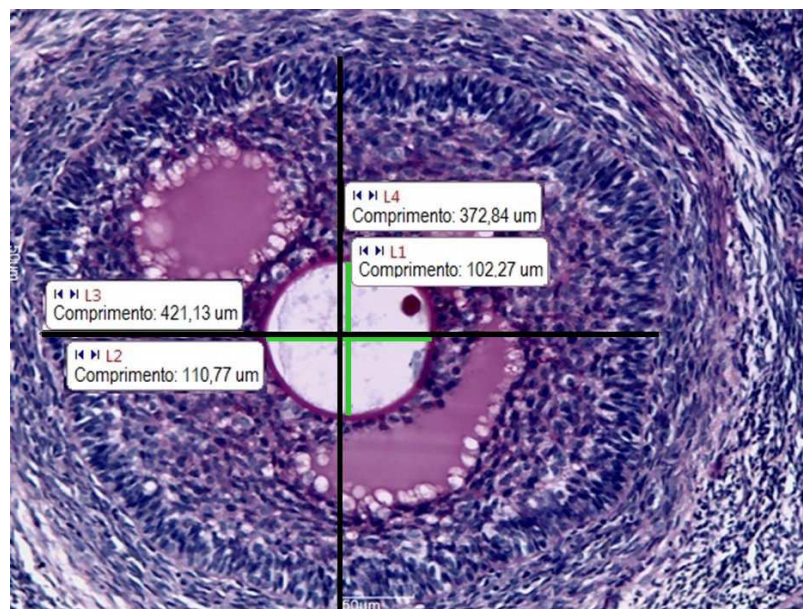


Figura 1. Fotomicrografia com representação esquemática de medidas realizadas nos folículos ovarianos, a partir da média de duas perpendiculares, para o oócito (L1 e L2) e para o folículo (L3 e L4), realizadas pelo programa Motic Images Plus 2.0 ML. Barra= 50µm.

Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa R software (R version 3.0.2). Os pressupostos de normalidade (Shapiro) e homocedasticidade (Levene) foram verificados e os dados referentes a macroscopia e a morfometria dos folículos (diâmetro médio de oócitos e número de MOFs) foram submetidos a análise de correlação de Spearman e ao teste de Wilcoxon para amostras independentes, respectivamente. Para todas as análises, foram considerados significativos os valores de ($p \leq 0,05$).

Resultados

Análise Macroscópica

Os pares de ovários avaliados apresentaram formato oval, com diâmetro médio de $16,64 \pm 3,17$ mm, com volume médio de $1,66 \pm 0,44$ dm³ e o peso médio foi de $1,13 \pm 0,60$ g. Corpos lúteos foram frequentemente visualizados (26/32), variando de um a três por ovário. A estimativa visual da população folicular ovariana apresentou média de $14,89 \pm 7,26$ folículos.

Os dados de medidas e mensurações macroscópicas dos ovários mostraram correlações positivas significativas (Tabela 1). Em relação ao diâmetro médio dos ovários por animal, houve uma correlação positiva significativa com a estimativa média da população folicular ($p= 0,0004$), com o total de corpos lúteos ($p= 0,043$), com o peso médio dos ovários ($p= 1,864^{-6}$) e com o volume médio dos ovários ($p= 3,477^{-5}$). A estimativa média da população folicular apresentou correlação significativa com o peso médio dos ovários ($p= 0,020$), com o volume médio dos ovários ($p= 0,024$). Referindo-se ao total de corpos lúteos, houve uma correlação significativa com o diâmetro médio dos ovários ($p= 0,043$), com o peso médio dos ovários ($p= 3,665^{-5}$) e com o volume médio dos ovários ($p= 0,0008$). Quando se correlacionou o peso médio dos ovários, encontrou-se níveis de significância com o volume médio dos ovários ($p= 1,387^9$).

Em relação aos folículos multioócitos, não houve correlação estatística significativa com nenhum dos parâmetros avaliados. Entretanto, houve tendência de correlação entre a população folicular média e o número total de folículos multioócitos ($p= 0,059$; Tabela 1).

Tabela 1. Correlação de medidas e mensurações macroscópicas dos ovários, e folículos multioócitos em ovinos.

	Diâmetro Médio por Animal	Média População Folicular/Animal	Total de Corpos Lúteos	Peso Médio dos Ovários (g)	Volume Médio dos Ovários (ml)	Total de MOF's
Diâmetro Médio por Animal	1	0,0004 (0,587)	0,043 (0,359)	1,864⁻⁰⁶ (0,732)	3,477⁻⁰⁵ (0,663)	0,535 (-0,114)
Média População Folicular/Animal	0,0004 (0,587)	1	0,365 (0,165)	0,020 (0,409)	0,0247 (0,396)	0,059 (-0,336)
Total de Corpos Lúteos	0,043 (0,359)	0,365 (0,165)	1	3,665⁻⁰⁵ (0,662)	0,0008 (0,563)	0,446 (-0,139)
Peso Médio dos Ovários (g)	1,864⁻⁰⁶ (0,732)	0,020 (0,409)	3,665⁻⁰⁵ (0,662)	1	1,387⁻⁰⁹ (0,843)	0,460 (-0,135)
Volume Médio dos Ovários (ml)	3,477⁻⁰⁵ (0,663)	0,024 (0,396)	0,0008 (0,563)	1,387⁻⁰⁹ (0,843)	1	0,662 (-0,080)
Total de MOF's	0,535 (-0,114)	0,059 (-0,336)	0,446 (-0,139)	0,460 (-0,135)	0,662 (-0,080)	1

Entre parênteses refere-se ao Índices de Correlação – Matriz de Spearman ($P < 0,05$). Para valores positivos, há uma relação de proporcionalidade positiva entre os parâmetros correlacionados. Para os valores negativos, não há correlação significativa.

Análise Histológica e Morfométrica

Dos 32 pares de ovários analisados, foram preparadas 8 secções histológicas por animal, totalizando 256 amostras analisadas, onde foram identificados 2477 folículos ovarianos, 87 folículos multioócitos primordiais e 12 folículos multioócitos primários e secundários.

Nas amostras analisadas os folículos primordiais foram encontrados com maior frequência, pois 92,51% da população folicular apresentava-se nesse estágio de desenvolvimento. O diâmetro médio para os folículos primordiais foi de $30,96 \pm 4,60 \mu\text{m}$ e seus respectivos oócitos apresentaram medidas de $25,09 \pm 1,61 \mu\text{m}$ (Figuras 2 e 3).

Os folículos primários representaram 1,0% da população folicular analisada e apresentaram um diâmetro médio de $50,96 \pm 8,52 \mu\text{m}$. Nestes folículos foram encontrados oócitos com diâmetro médio de $34,42 \pm 4,50 \mu\text{m}$ (Figuras 2 e 3). Com relação aos folículos secundários (Figuras 2 e 3), estes representaram 1,0% dos folículos analisados nos cortes histológicos. O diâmetro médio folicular foi de

86,48 ± 21,85 µm acompanhado por um diâmetro médio dos oócitos de 49,01 ± 11,49 µm.

Folículos antrais foram encontrados em quase todos ovários analisados, correspondendo 1,98% dos folículos ovarianos analisados. Na análise morfométrica foram considerados apenas folículos antrais nos estágios iniciais e intermediários de desenvolvimento. O diâmetro médio folicular e dos oócitos foram de 226,26 ± 69,93 µm e 66,26 ± 11,01 µm, respectivamente (Figuras 2 e 3).

A presença de folículos multioócitos foi observada na maioria dos ovários avaliados (87,50%; 28/32). Os folículos multioócitos primordiais representaram 3,51% da população folicular ovariana, sendo mais frequentes que os folículos primários (1,0%), secundários (1,0%) e antrais iniciais (1,98%). Observou-se com frequência estruturas variando de dois a cinco oócitos em um mesmo folículo, com maior predominância de folículos com três oócitos. Foram observados 62 e 37 folículos multioócitos primordiais nos ovários esquerdo e direito, respectivamente. Apesar de haver um aumento numérico na presença de folículos multioócitos primordiais nos ovários esquerdo, este não foi significativo comparado ao número de folículos multioócitos dos ovários direito. Em relação a população de folículos primordiais, foi observado 1117 nos ovários direito e 1187 no ovários contralateral, sendo esta diferença não significativa.

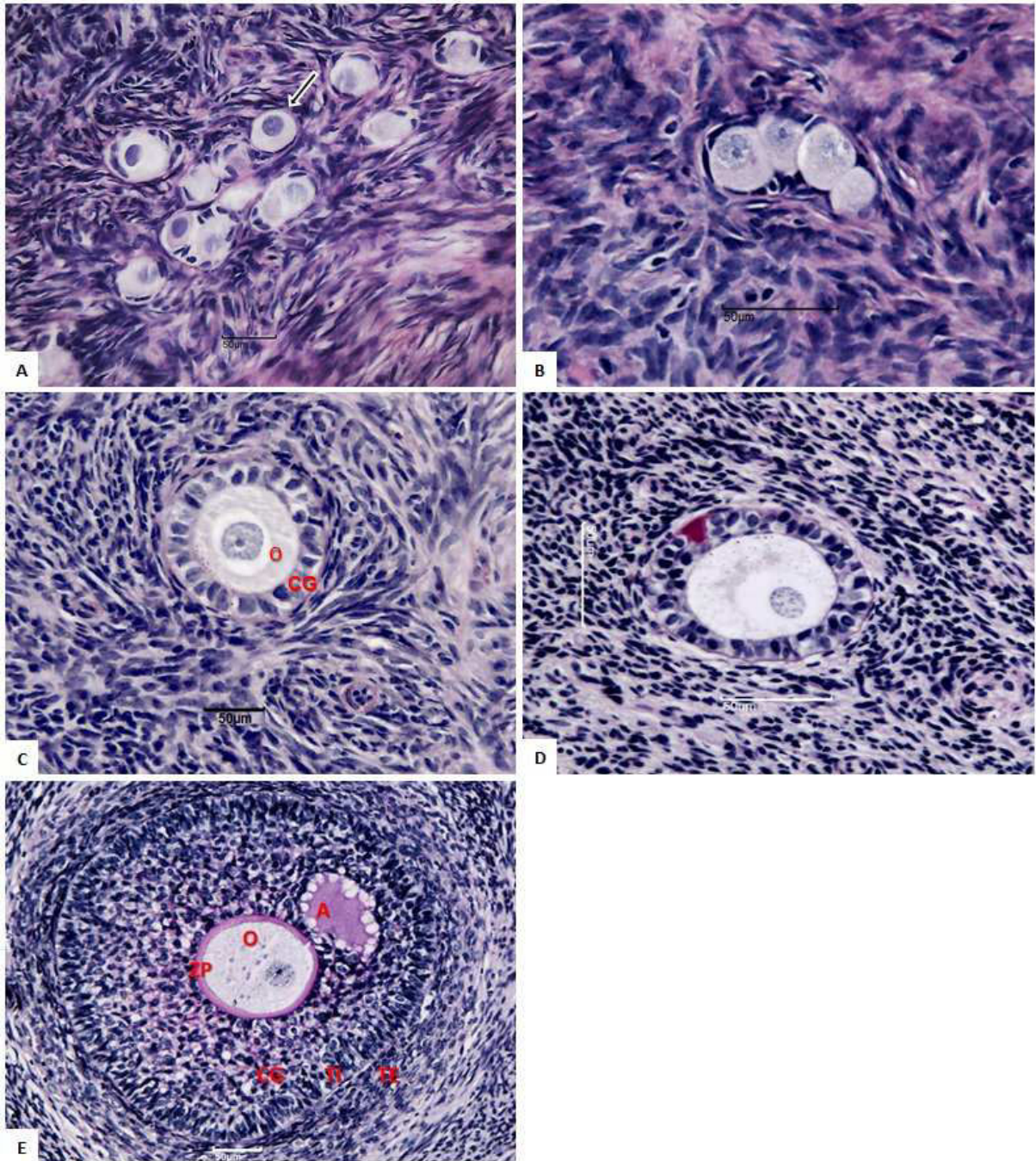


Figura 2. Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de ovino corado em PAS. A– Folículo Primordial (seta); B– Folículo multioócito com quatro oócitos; C– Folículo Primário: oócito (O), células da granulosa (CG); D– Folículo Secundário; E– Folículo Antral: oócito (O), zona pelúcida (ZP), antro (A), células da granulosa (CG), teca interna (TI) e teca externa (TE). Barras = 50µm.

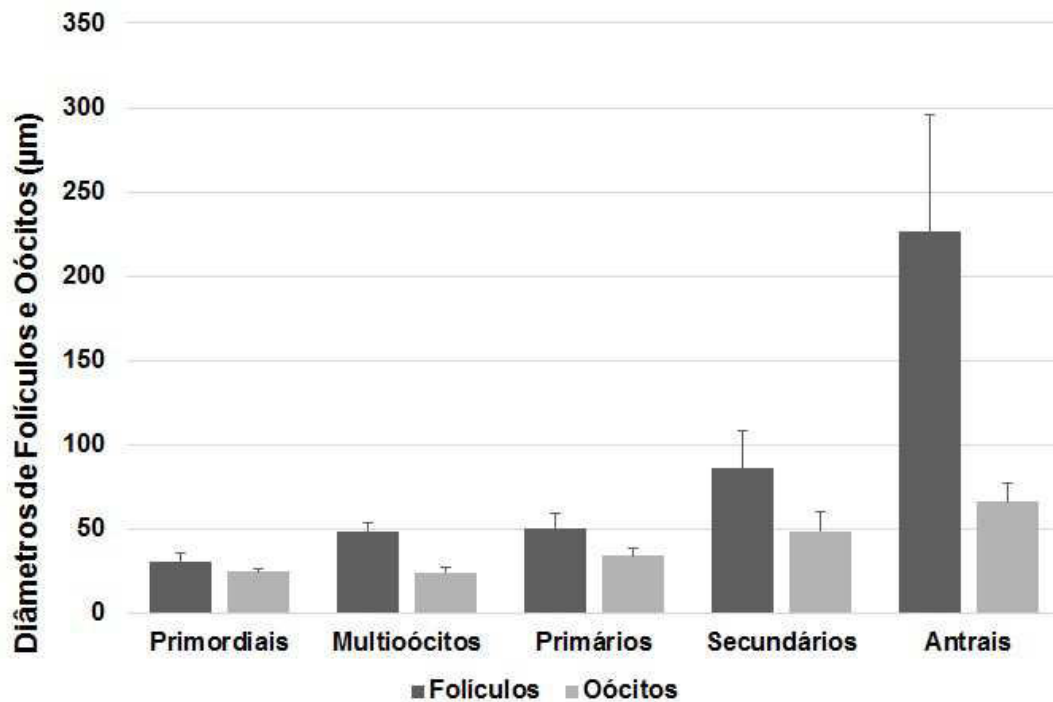


Figura 3. Distribuição dos diâmetros médios das medidas dos folículos e seus respectivos oócitos nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular em ovários de ovinos.

O diâmetro médio dos folículos multioócitos, encontrados predominantemente em estágio primordial de desenvolvimento, foi de $48,62 \pm 5,66$ μm com seus respectivos oócitos medindo $24,31 \pm 3,35$ μm de diâmetro (Figuras 2 e 3). Em relação ao diâmetro dos oócitos presentes nos folículos com um oócito comparados aos folículos multioócitos, ambos em estágio primordial, não foi observada diferença estatística ($p=0,27$), uma vez que os folículos com apenas um oócito apresentaram em seus oócitos diâmetros médios de $25,09 \pm 1,61$ μm .

Discussão

Poucos são os relatos sobre a foliculogênese em ovinos e o quanto a reserva ovariana folicular pode influenciar na produção e recuperação de oócitos em procedimentos assistidos. Este estudo relata a morfologia e morfometria progressiva folicular e oocitária nos diversos estágios de desenvolvimento folicular ovariano em ovinos. As características morfológicas observadas para os diferentes estágios de desenvolvimento são semelhantes às descritas anteriormente para a espécie (CAHILL; MAULÉON, 1981; LUNDY *et al.*, 1999; BARTLEWSKI *et al.*, 2011). Como em outras espécies animais, a maioria dos folículos ovarianos observados são representados por folículos primordiais quiescentes e um número expressivamente menor de folículos em fase de desenvolvimento (LUNDY *et al.*, 1999).

Observou-se que a população folicular ovariana dos animais avaliados apresentou um aumento progressivo no diâmetro dos oócitos conforme o desenvolvimento folicular (primordiais, primários, secundários e antrais; Figura 2F). Também é interessante ressaltar que o tamanho médio dos oócitos em diferentes espécies como caninos, primatas, felinos e *Tayassu tajacu* (cateto) foi diferente entre os indivíduos e apresentaram aumento progressivo do estágio primordial ($27,50\mu\text{m}$; $15,6 \pm 0,39\mu\text{m}$; $40,5 \pm 0,8\mu\text{m}$; $25,43 \pm 1,30\mu\text{m}$) para o estágio primário ($34,91\mu\text{m}$; $25,2 \pm 0,78\mu\text{m}$; $63,8 \pm 1,4\mu\text{m}$; $28,96 \pm 1,79\mu\text{m}$) e demais estágios de desenvolvimento folicular (DIAGONE *et al.*, 2008; REYNAUD *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2012, LIMA *et al.*, 2013)

Na mesma espécie, existem variações individuais no diâmetro dos folículos e oócitos. Dessa forma, nossos resultados diferem dos apresentados por Lundy *et al.* (1999), que obtiveram em folículos de ovinos lanados os diâmetros médios de $34,6 \mu\text{m}$ para os primordiais, $52,1 \mu\text{m}$ para os primários, $72,9 \mu\text{m}$ para os secundários e $326,9 \mu\text{m}$ para os folículos antrais. Isto pode ser explicado por diferentes aspectos. Sob o ponto de vista hereditário, o fator genético pode exercer grande influência no indivíduo, uma vez que a espécie ovina é cosmopolita, sendo criada em praticamente todos os continentes e desafiadas sob as mais variadas condições ambientais, sofrendo consideráveis pressões de seleção no decorrer da sua história de domesticação pelo homem. Outro fator de igual relevância e interligado, refere-se à estacionalidade reprodutiva, pois é sabido que algumas espécies, dentre elas os pequenos ruminantes, sofrem grandes influências do

fotoperíodo, ou seja, muitas raças lanadas, de climas frios e temperados, apresentam estacionalidade reprodutiva marcante (SASA *et al.*, 2002; SMITH; CLARKE, 2010), enquanto raças deslanadas, originárias de regiões tropicais, sofrem poucas influências do fotoperíodo (SASA *et al.*, 2002), como é o caso da raça utilizada no presente estudo.

Os resultados deste estudo demonstraram a presença de folículos multioócitos na maioria dos ovários avaliados (87,50%; 28/32). Os folículos multioócitos foram encontrados em maior quantidade que os folículos secundários e, quando encontrados em um determinado ovário, frequentemente apareciam em multiplicidade. A origem dos folículos multioócitos é desconhecida, embora tenha sido proposto que eles derivem de uma falha na separação das células germinativas durante o início das fases da foliculogênese ou do rápido desenvolvimento das células germinativas quando comparadas à diferenciação das células somáticas que circundam os oócitos, resultando na inclusão de várias células germinativas dentro de um folículo (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

A frequência dos MOFs é variada entre as espécies, dentro da mesma espécie e entre os indivíduos. Este estudo mostrou não haver diferença significativa quanto à prevalência dos folículos multioócitos nos ovários direito e esquerdo do grupo experimental, sendo que estas estruturas estavam distribuídas homogeneamente nos pares de ovários. Em se tratando do diâmetro médio dos oócitos dos folículos contendo um oócito comparados aos diâmetros dos MOFs, não houve diferença significativa entre as medidas no estágio primordial de desenvolvimento.

Esses resultados sugerem que mesmo havendo vários oócitos em um mesmo folículo, os mesmos apresentam desenvolvimento normal, não havendo competições ou dominâncias entre eles. Se houvesse, possivelmente refletiria em um subdesenvolvimento com possíveis sinais patológicos de degeneração, como picnose, desorganização da cromatina, retração folicular e vacuolização, aspectos estes passíveis de visualização em microscopia (TING *et al.*, 2011) e que não foram observados em nenhum dos MOFs avaliados. Indicando que desenvolvem-se naturalmente com aporte fisiológico suficiente para que alcancem os estágios antrais, conforme afirmações feitas por Payan-Carreira e Pires (2008) e Lunardon, (2013). Em estudos com gatos, Reynaud (2010) demonstrou a possibilidade dos oócitos dos folículos multioócitos não estarem no mesmo estágio de

desenvolvimento, pois, observaram em folículos antrais, oócitos circundados por diferentes quantidades e camadas de células da granulosa.

Neste estudo não houve comparação de folículos multioócitos com animais jovens. Nossos resultados demonstram que folículos multioócitos foram observados na maioria dos ovários avaliados, predominantemente composto por fêmeas adultas em idade reprodutiva. Nossas afirmações são reforçadas por Reynaud *et al.* (2009), que em estudos realizados com cadelas encontraram grande incidência de folículos multioócitos em estágios finais de desenvolvimento e afirmaram que apesar de não se saber os fatores envolvidos na seleção dos oócitos, possivelmente um ou dois oócitos dos MOFs possam ter a capacidade de ser fecundado. Dessa forma, são necessários mais conhecimentos quanto à fisiologia e viabilidade dos MOFs, com a aplicação de técnicas capazes de demonstrar a atividade dessas estruturas e sua viabilidade nos folículos ovarianos ovinos.

Os resultados deste estudo nos permitiu concluir, que os folículos multioócitos primordiais apresentam diâmetro maior que os folículos primordiais contendo um oócito, entretanto, seus respectivos oócitos apresentam diâmetros aproximados. Em relação à presença de MOFs nos ovários direitos ou esquerdos, não houve diferença na prevalência destas estruturas nos ovários dos ovinos avaliados. Quanto às correlações macroscópicas, houve correlação positiva entre o tamanho, volume e peso dos ovários, a quantidade de corpos lúteos e a população folicular ovariana, contudo, nenhum destes parâmetros apresentou correlação com a quantidade de MOFs nos ovários.

Referências

- ALM, H.; KUHLMANN, S.; LANGHAMMER, M.; TUCHSCHERER, A.; TORNER, H.; REINSCH, N. Occurrence of polyovular follicles in mouse lines selected for high fecundity. **Journal of Reproduction and Development**, v.56 n.4, p.449-53, 2010.
- ALMEIDA, D.V.; SANTOS, R.R.; SCALERCIO, S.R.; LEÃO, D.L.; HARITOVAD, A.; OSKAME, I.C.; DOMINGUESA, S.F.S. Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Animal Reproduction Science**, v.134, p.210–215, 2012.
- AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÉS, J. Ph. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.82, p.15-25, 1988.
- BALCIUNIENE, J.; BARDWELL, V.J.; ZARKOWER, D. Mice Mutant in the DM Domain Gene *Dmrt4* Are Viable and Fertile but Have Polyovular Follicles. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 23, p.8984–8991, 2006.
- BARTLEWSKI, P.M.; BABY, T.E.; GIFFIN, J.L. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.259–268, 2011.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*felis catus*). **Theriogenology**, v.66, n.1, p.5–13, 2006.
- CAHILL, L.P.; MAULÉON, P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.61, p. 201-206, 1981.
- DEMNICIS B.B.; LIMA, L.C.O.; ARAÚJO, S.A.C.; LUNGA, L.; BLUME, M.C. Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. **PUBVET**, v.2, p.1-19, 2008.
- DIAGONE, K.V.; VICENTE, W.R.R.; PACHECO, M.R. AND MATEUS, O. Oocyte Morphometry in Female Dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Anatomy Histology Embryology**, v.37, p.81–85, 2008.
- FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importance of the biotechnique of MOEPF for the study of folliculogenesis and in vitro embryo production in large scale. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.143–152, 2007.

GRAHAM, C.E.; BRADLEY, C.F. Polyovular follicles in squirrel monkeys after prolonged diethylstilboestrol treatment. . **Journals of Reproduction & Fertility**, v.27, p.181-185, 1971.

HA JR, K. Polyovular follicles and multinucleate ova in the ovaries of young rats. **The Anatomical Record**, v.142, p.25-29, 1962.

IGUCHI, T.; TODOROKI, R.; TAKASUGI, N.; PETROW, V. The effects of an aromatase inhibitor and a 5 α -reductase inhibitor upon the occurrence of polyovular follicles, persistent anovulation, and permanent vaginal stratification in mice treated neonatally with testosterone. **Biology of Reproduction**, v.39, p.689-697, 1988.

IGUCHI, T.; FUKAZAWA, Y.; UESUGI, Y.; TAKASUGI, N. Polyovular Follicles in Mouse Ovaries Exposed Neonatally to Diethylstilbestrol in Vivo and in Vitro. **Biology of Reproduction**, v.43, p.478-484, 1990.

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, n.79, p.1219-1225, 2008.

JEFFERSON, W.N.; COUSE, J.F.; PADILLA-BANKS, E.; KORACH, K.S.; NEWBOLD, R.R. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for erb-mediated and nonestrogenic actions. **Reproductive Toxicology**, v.30, p.550–557, 2010.

KIM, H.; HAYASHI, S.; CHAMBON, P.; WATANABE, H.; IGUCHI, T.; SATO, T. Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice. **Reproductive Toxicology**, v.27, p.55–62, 2009a.

KIM, H.; NAKAJIMA, T.; HAYASHI, S.; CHAMBON, P.; WATANABE, H.; IGUCHI, T.; SATO, T. Effects of Diethylstilbestrol on Programmed Oocyte Death and Induction of Polyovular Follicles in Neonatal Mouse Ovaries. **Biology of Reproduction**, v.81 n.5, p.1002-1009, 2009b.

LIMA, G.L.; SANTOS, E.A.A.; LUZ, V.B.; RODRIGUES, A.P.R. AND SILVA, A.R. Morphological Characterization of the Ovarian Preantral Follicle Population of Collared Peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). **Anatomy Histology Embryology**, v.42, p.304–311, 2013.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÃO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v.56, p.223–236, 1999.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÃO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, n.57, p.1467-1483, 2002.

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

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N.L.; McNATTY, K.P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.251-262, 1999.

McDOUGALL, K.; HAY, M.A.; GOODROWE, K.L.; GARTLEY, C.J.; KING, W.A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, n.51, p.25-31, 1997.

MICLAUS V.; GROZA, I.; OANA, L. Domestic cat (*Felis catus*) polyovular follicles. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca**, v.64, p.1-2, 2007.

MORAES JCF, SOUZA DCJH, JAUME CM. Organização e gestão de um programa de controle da reprodução ovina com foco no mercado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.227-233, 2007.

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

REYNAUD, K.; VIARIS, D.E.; LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**, v.72, p.1120–1131, 2009.

REYNAUD, K.; HALTER, S.; TAHIR, Z.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. Les follicules polyovocytaires. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.38, p.395–397, 2010.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, S.H.; SILVA, J.R.; MATOS, M.H.; LUCCI, C.M.; BAO, S.N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249–263, 2006.

SASA, A.; TESTON, D.C.; RODRIGUES, P.A.; COELHO, L.A.; SCHALCH, E. Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Borregas Lanadas e Deslanadas no Período de Abril a Novembro, no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1150-1156, 2002.

SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G.S.; MORA, J.M.; MOBBERLEY, M.; RYDER, T.A.; BAITHUN, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v.121, p.3890-3900, 2008.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, p.1051–1057, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.; SILOTO, L.S.; SANTOS, GMG; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T.N. AND SENEDA, M.M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.48–51, 2014.

SMITH, J.T.; CLARKE, I.J. Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.324, p.102–109, 2010.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v.123, p.185–202, 2002.

STANKIEWICZ, T.; BLASZCZYK, B.; UDALA, J. A Study on the Occurrence of Polyovular Follicles in Porcine Ovaries with Particular Reference to Intrafollicular Hormone Concentrations, Quality of Oocytes and their in vitro Fertilization. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.38, p.233–239, 2009.

TELFER, E.; GOSDEN, R.G. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). **Journals of Reproduction & Fertility**, v.81, p.137–147, 1987.

TING, A.Y.; YEOMAN, R.R.; LAWSON, M.S.; ZELINSKI, M.B. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v.26, n.9, p. 2461–2472, 2011.

TINGEN, C.; KIM, A.; WOODRUFF, T.K. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.12 p. 795–803, 2009.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v.78, p.1153-1161, 2008.

ARTIGO 2

**“Atividade Proliferativa de Folículos Multioócitos em Ovários
Ovinos (*Ovis aries*)”**

Atividade Proliferativa de Folículos Multioócitos em Ovários Ovinos (*Ovis aries*)

Resumo

Folículos multioócitos (MOFs) têm sido descritos com frequência em estudos de população folicular, entretanto, seu desenvolvimento e atividade proliferativa são pouco estudados. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência e a atividade dos folículos multioócitos em ovários de fêmeas ovinas. Pares de ovários (n = 32) obtidos em abatedouro foram avaliados quanto à atividade celular proliferativa, através da expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e da proteína detectada pelo anticorpo Ki-67. A análise para PCNA foi realizada através de escore histológico e após verificado a ausência de normalidade e homocedasticidade, os dados foram analisados através do teste de Wilcoxon para amostras dependentes. Houve imunexpressão positiva para o PCNA em todos os estágios de desenvolvimento folicular e não houve diferença ($p > 0,05$) entre as imunomarcações dos oócitos dos folículos contendo um oócito e folículos multioócitos. Não houve diferença significativa no número de folículos multioócitos imunomarcados no ovário esquerdo quando comparados ao ovário direito. Para a imunexpressão de Ki-67, realizou-se avaliação qualitativa e não houve imunomarcagem positiva para os folículos em estágio primordial. Entretanto, em todos os outros estágios de desenvolvimento, observou-se imunomarcagem positiva, tanto para folículos com um oócito quanto para MOFs. Desta forma, folículos multioócitos presentes em ovários ovinos apresentaram atividade proliferativa e possivelmente são capazes de se desenvolver até estágios antrais.

Palavras-chave: Foliculogênese. Imuno-histoquímica. Ki-67. PCNA.

Introdução

Estudos sobre a população de folículos ovarianos pré-antrais, que constituem 90 % de todos os folículos ovarianos (HASHIMOTO *et al.*, 2007), são essenciais para o conhecimento da fisiologia reprodutiva e adequada aplicação de biotecnologias reprodutivas, uma vez que a reserva ovariana é estabelecida ainda na fase pré-natal e, após o nascimento, os folículos ovarianos vão sendo consumidos gradativamente durante a vida reprodutiva (EGGAN *et al.*, 2006).

Os folículos ovarianos dos mamíferos contêm um único oócito, embora, diversos autores chamem a atenção aos casos em que folículos apresentam dois ou mais oócitos, que estão contidos dentro de um único folículo sem uma membrana basal que os separe (TINGEN *et al.*, 2009). Várias espécies já foram descritas com estas estruturas, tais como, coelhos (AL-MUFTI *et al.*, 1988), cães (TELFER; GOSDEN, 1987; PAYAN-CARREIRA; PIRES, 2008; REYNAUD *et al.*, 2009), suínos (STANKIEWICZ *et al.*, 2009), caprinos (LUCCI *et al.*, 1999), ovinos (SANTOS *et al.*, 2006) e bovinos (LUCCI *et al.*, 2002; SILVA-SANTOS *et al.*, 2011).

Acredita-se que estes folículos sejam formados nas fases iniciais da foliculogênese e seu desenvolvimento não seja nem um espúrio nem um fenômeno patológico, mas sim um polimorfismo natural, resultante de uma gama de possíveis combinações numéricas de oócitos e células da pré-granulosa (TELFER; GOSDEN, 1987). Informações sobre as propriedades morfológicas e funcionais dos folículos multioócitos na espécie ovina são pouco esclarecidas e isto tem estimulado estudos para compreender os fatores envolvidos no desenvolvimento dessas estruturas.

Biomarcadores como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e proteína Ki-67 são amplamente utilizados para caracterizar diferentes aspectos do desenvolvimento celular. OKTAY *et al.* (1995) demonstraram em seus estudos que os marcadores para proliferação, reguladores essenciais do ciclo celular, são sensíveis para identificar a atividade celular e o início do crescimento folicular.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a prevalência e comparar a atividade proliferativa de folículos multioócitos em ovários de fêmeas ovinas, a fim de compreender se apresentam desenvolvimento semelhante aos demais folículos ovarianos.

Material e Métodos

Animais

Ovários de ovinos, da raça Santa Inês (n=32) com idade média de 36 meses foram obtidos em abatedouro no município de Umuarama-PR. Após a obtenção dos ovários, os mesmos foram lavados em álcool 70% e posteriormente submetidos a dois enxagues em solução salina 0,9%. Na sequência, foi estimada visualmente a quantidade de folículos maiores que dois milímetro, avaliados externamente quanto a presença de corpos lúteos, mensurados e pesados em balança analítica (Bel[®], Monza- Itália). Posteriormente, os ovários foram seccionados longitudinalmente em duas metades (hemi-ovários) e imersos em solução de formalina tamponada a 10% para processamento histológico.

Processamento Histológico

Para analisar a morfologia ovariana, os hemi-ovários foram fixados em formalina tamponada por 24 horas e então, mantidos em álcool 70%. Foram então desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e incluídos em blocos para cortes histológicos. Os blocos foram então cortados em micrótomo rotativo (Leica[®], Wetzlar- Alemanha) em cortes seriados de 5µm de espessura. A cada 50^o secção histológica foram montadas três lâminas subsequentes (réplicas): uma lâmina para avaliação morfológica corada pelo Reativo de Schiff (PAS) e duas outras para avaliação da atividade proliferativa, utilizando o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e a proteína Ki-67.

Morfologia dos Folículos Multioócitos

A coloração em Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi usada para caracterizar morfológicamente os folículos ovarianos, além de determinar a morfometria nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular. Uma vez que os folículos multioócitos eram identificados nas lâminas coradas pelo Reativo de Schiff, foi realizada a imuno-histoquímica nas réplicas subsequentes. Nos casos em que os

folículos multioócitos não eram visualizados, procedeu-se à confecção de novas lâminas, após realização de cortes seriados até atingir o intervalo de 50 secções. Para cada hemi-ovário foram preparadas de 3 a 5 lâminas com 3 réplicas para cada uma.

Avaliação Imuno-histoquímica

A proliferação celular foi avaliada por meio do exame imuno-histoquímico, utilizando-se o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a proteína Ki-67. Os anticorpos utilizados foram anti-PCNA (anticorpo monoclonal clone PC10, diluição 1:200, Zymed®, Carlsbad, CA) e anti-Ki-67 (clone 7B11, diluição 1:50, Zymed®, Carlsbad, CA). Os protocolos, controles positivos e negativos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os cortes histológicos foram desparafinados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica, utilizando-se para PCNA solução de citrato (pH 6,0) e Ki-67 solução de tris-EDTA tween (pH 9,0) com incubação em forno de micro-ondas por aproximadamente 12 minutos. Na sequência, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio em metanol na proporção de 50% (v/v) por 20 minutos. Os anticorpos anti-PCNA e anti-Ki-67 foram incubados “*overnight*” (18 horas). Após a incubação, o anticorpo secundário foi conjugado por 20 minutos e, em seguida, a reação foi revelada pelo substrato Diaminobenzidina (DAB) em aproximadamente três minutos. Posteriormente, o material foi contra corado pela Hematoxilina de Harris, desidratado e as lâminas foram montadas. As imunorexpressões de PCNA foram estimadas por contagem de imunomarcção positiva de células com citoplasma e núcleo fortemente corados, em microscopia de luz, objetivas de 20 e 40X, conforme o estágio de desenvolvimento folicular. Os folículos foram considerados positivos quando apresentavam 50% ou mais de imunomarcção das células. Para o Ki-67, realizou-se uma avaliação qualitativa, ou seja, pela presença ou ausência de imunomarcção.

Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa R software (R version 3.0.2). Os dados da imunomarcção para o antígeno PCNA, dos folículos ovarianos foram comparados usando Teste Exato de Fisher. A prevalência dos folículos multioócitos dos ovários direito e esquerdo, foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro) e homocedasticidade (Levenne) e analisados através do teste de Wilcoxon para amostras dependentes. Para todas as análises, foram considerados significativos os valores de ($p \leq 0,05$).

Resultados

Para a técnica de imuno-histoquímica foram avaliadas 291 secções histológicas, a partir dos pares de ovários de 32 fêmeas ovinas. A imunexpressão do PCNA foi analisada nas células da granulosa dos folículos com um oócito e multioócitos no estágio primordial e demais estágios de desenvolvimento.

A imunomarcção positiva para o antígeno anti-PCNA foi observada em 97,81% dos folículos contendo um oócito, nos diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 1A) (2819/2882) e em 97,22% dos folículos multioócitos (70/72) presentes nos ovários (Fig. 2E), não apresentando diferença significativa ($p=0,99$) entre as imunomarcações PCNA-positivo das células da granulosa dos folículos e seus respectivos oócitos.

A imunexpressão do antígeno PCNA também foi observada em folículos contendo um oócito nos diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 1B, C e D) e nos estágios iniciais de desenvolvimento dos folículos multioócitos (Fig. 1E). Não houve diferença significativa no número de folículos multioócitos imunomarcados no ovário esquerdo quando comparados ao ovário direito.

Os folículos que apresentaram imunexpressão positiva para o antígeno anti-PCNA foram submetidos à avaliação qualitativa de proliferação celular pelo antígeno Ki-67. O antígeno anti-ki-67 permitiu observar imunomarcção positiva em folículos multioócitos nos estágios iniciais de desenvolvimento e também nos folículos com um oócito nos diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 2).

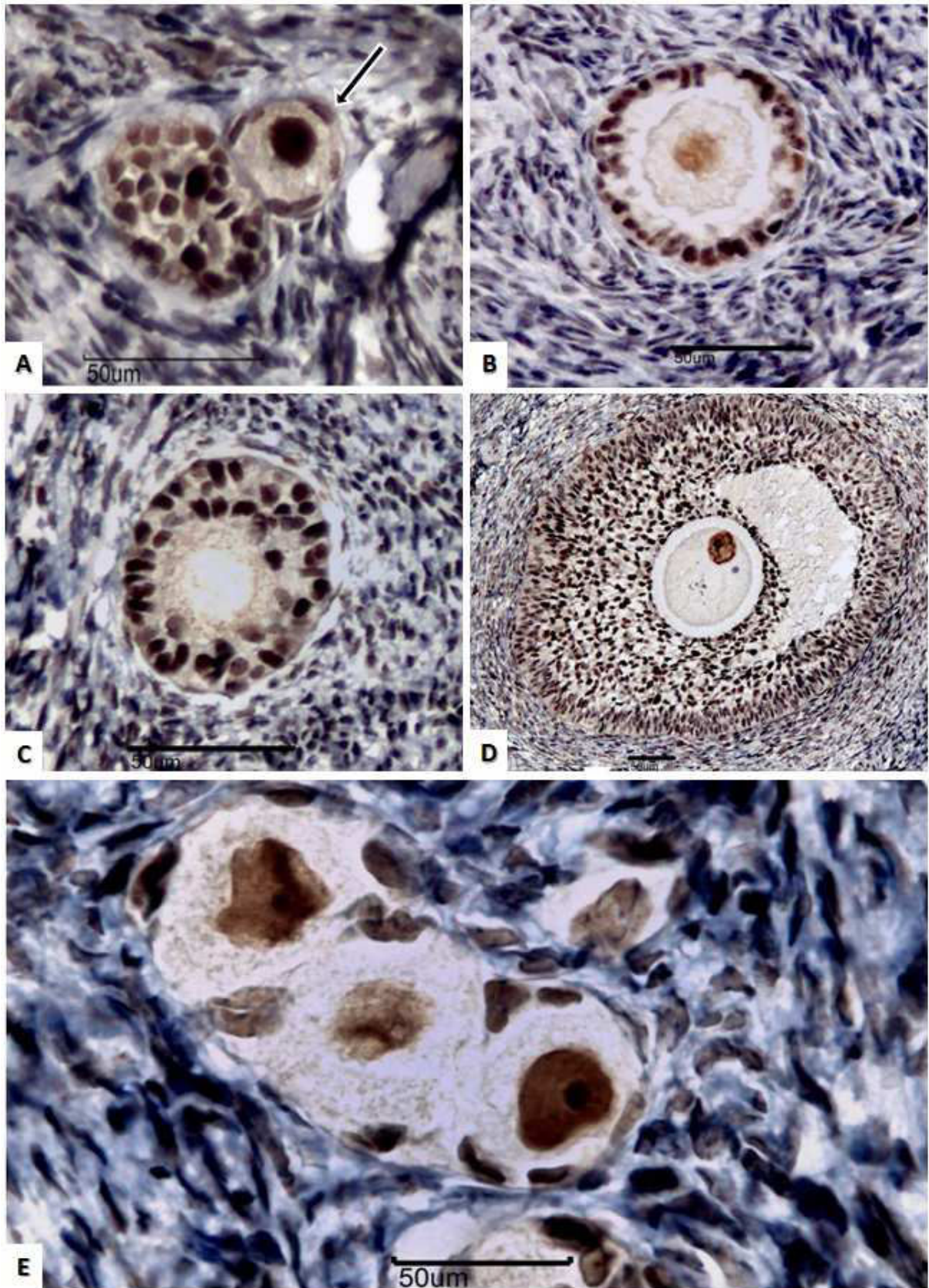


Figura 1. Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário ovino, marcados (castanho) pelo anticorpo anti-PCNA. A- Folículo primordial (seta). B – Folículo primário. C- Folículo Secundário. D- Folículo Antral. E- Folículo multioócitos contendo 3 oócitos. Barras = 50µm.

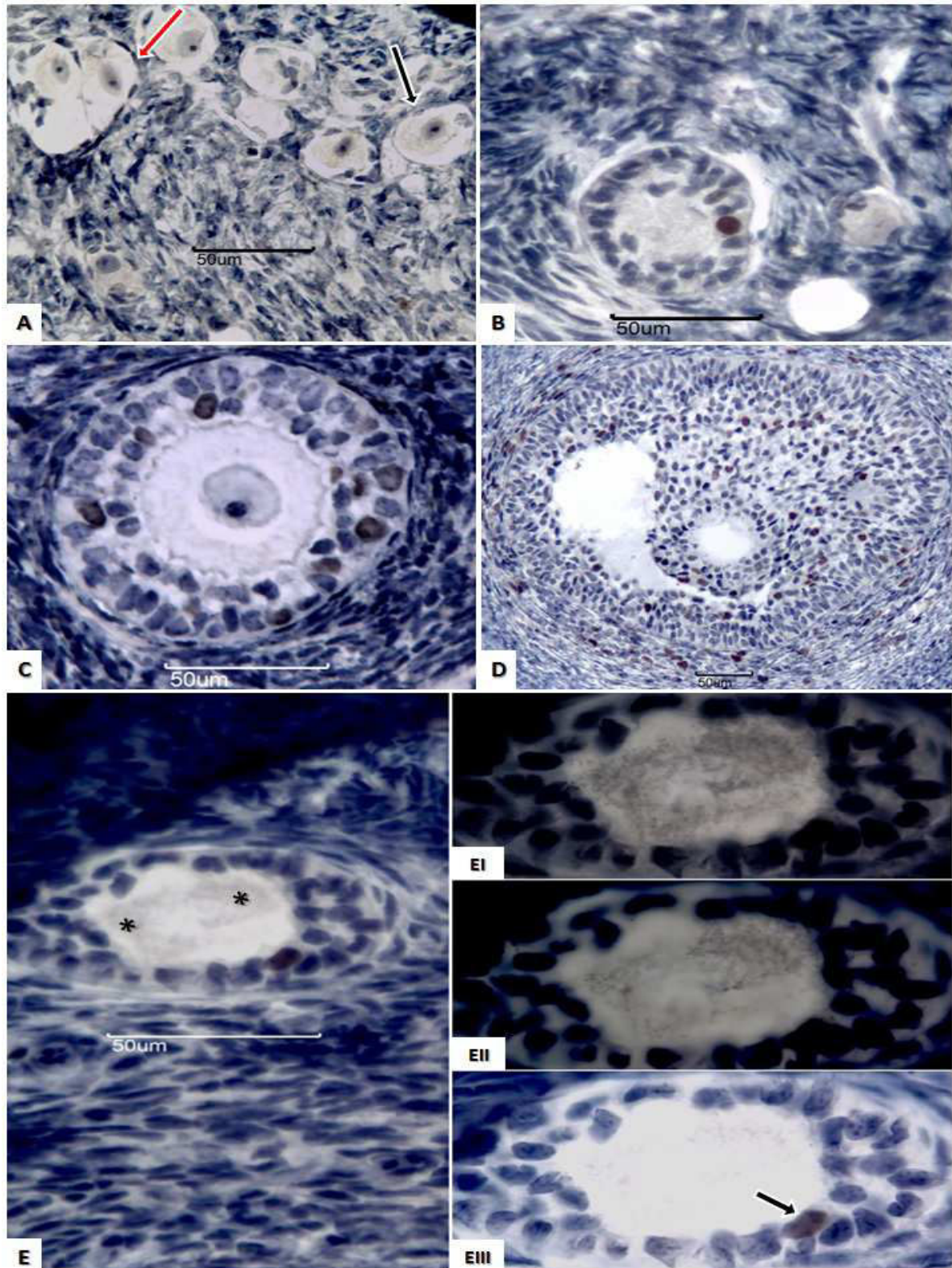


Figura 2. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovário ovino submetidos ao anticorpo anti-Ki-67. A– Folículos Primordiais com um único oócito (seta preta) e multioócitos (seta vermelha) com imunomarcações negativas; B– Folículos primário em transição com imunomarcação positiva (seta); C– Folículo secundário com imunomarcação positiva (castanho); D– Folículo Antral - imunomarcação positiva (castanho); E– Folículo Multioócito Secundário com dois oócito (asterisco) com imunomarcação positiva; EI- Detalhe folículo multioócito secundário evidenciando os dois oócitos, 100x; EII- Detalhe folículo multioócito secundário evidenciando oócitos em diferentes planos de disposição, 100x; EIII- Detalhe folículo multioócito secundário evidenciando imunomarcação positiva em célula da granulosa (seta), 100x. Barras = 50µm.

Discussão

A foliculogênese em ovinos é pouco estudada e ainda não foi compreendida a influência da reserva ovariana de folículos pré-antrais na produção e recuperação de oócitos em procedimentos assistidos. Até o momento, não existem relatos sobre a atividade proliferativa de folículos multioócitos em ovários mamíferos. O presente estudo analisou aspectos histológicos e a atividade proliferativa de folículos pré-antrais da espécie ovina.

Na maioria dos ovários analisados foi observada a presença de folículos multioócitos (72). Folículos multioócitos já foram relatados em ovários de diversas espécies de mamíferos. Uma melhor compreensão sobre estas estruturas estimula os pesquisadores, pois poderiam contribuir para uma maior quantidade de oócitos recuperados em procedimentos assistidos e também de embriões (PAYAN-CARREIRA; PIRES, 2008). Entretanto, a função destes folículos e sua real contribuição para a foliculogênese permanecem desconhecidas.

Quanto à origem destas estruturas, há divergência de opiniões na literatura. Alguns autores acreditam que sejam originados da divisão meiótica dos oócitos (BEN-RAFAEL *et al.*, 1987), outros acreditam que se originam pela não separação pelo tecido conjuntivo no momento da individualização das oogônias (ZEILMAKER *et al.*, 1983; BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

Em nosso estudo, a imunexpressão pelo antígeno anti-PCNA em folículos contendo um único oócito foi positiva, tanto nos estágios primordiais como nos antrais (Figura 1). Em trabalhos realizados com ratos, bovinos e suínos houve imunomarcagem pelo PCNA em folículos pré-antrais, porém, não foi verificada imunexpressão para folículos primordiais Oktay *et al.* (1995), Wandji *et al.* (1996) e Tománek e Chronowska (2006). Esta ausência de marcação com o PCNA provavelmente deva-se ao fato das células da granulosa estarem na fase de mitose (M), cuja expressão do antígeno é drasticamente reduzida.

Nossos resultados sugerem que a imunomarcagem para PCNA no estágio primordial seja devido ao seu papel na maquinaria de replicação e reparação do DNA durante a divisão celular (MYOUNG *et al.*, 2006; STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011), além de apresentar meia-vida longa (cerca de 20 horas), resultando na imunexpressão de células que já tenham deixado a fase de divisão celular (MEER *et al.*, 2003; MYOUNG *et al.*, 2006).

Em relação à imunopressão do anticorpo anti-Ki-67, observou-se marcação mais discreta e mais específica nos folículos contendo um único oócito, confirmando imunomarcações expressas pelo antígeno anti-PCNA. No entanto, não houve marcação em nenhum dos folículos ovarianos em estágio primordial (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva-Buttkus *et al.* (2008) com camundongos, que encontraram imunomarcação para Ki-67 somente em uma pequena quantidade de folículos primordiais, e imunopressão crescente de acordo com o desenvolvimento dos folículos para os estágios subsequentes. Estes resultados sugerem que a maioria dos folículos primordiais da reserva ovariana estão em quiescência (fase G0), concordando com relatos de que a imunopressão do anticorpo Ki-67 atinge seu pico em M, sendo rapidamente degradada após a mitose e ausente na fase G0, além de possuir meia vida menor em relação ao PCNA (60-90 min.; KLEIN-SZANTO, 2000; BROWN; GATTER, 2002; MEER *et al.*, 2003; MYOUNG *et al.*, 2006; LIU; GONG *et al.*, 2009).

Em relação aos folículos multioócitos, os mesmos possuem atividade celular proliferativa e não houve diferença em relação aos folículos contendo apenas um oócito no mesmo estágio de desenvolvimento. Nossos resultados comprovam que tanto o antígeno anti-PCNA como o anti-Ki-67 são capazes de demonstrar atividade proliferativa nos diferentes estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos. O antígeno anti-PCNA apresentou imunopressão nos estágios primordiais tanto para folículos com um oócito quanto para folículos multioócitos e também para os demais estágios do desenvolvimento folicular (Figura 1), resultado semelhante aos encontrados em primatas, bovinos e ovinos (GOUGEON; BUSSO, 2000; WANDJI *et al.*, 1996; LUNDY *et al.*, 1999).

Para os demais estágios de desenvolvimento folicular, nossos resultados demonstram imunopressão positiva para Ki-67 tanto para folículos com um oócito quanto para folículos multioócitos (Figura 2). A imunomarcação dos folículos multioócitos também foi positiva nos estágios pré-antrais (Figura 2), demonstrando que estes folículos estão em desenvolvimento. Nossos resultados contrariam os descritos por Telfer e Gosden (1987) e Payan-Carreira e Pires (2008), que descreveram a presença dos folículos multioócitos somente em animais jovens e estágios iniciais de desenvolvimento folicular, mas estão de acordo com os descritos por Reynaud *et al.* (2009), que encontraram alta incidência de folículos multioócitos em estágios finais de desenvolvimento em cadelas adultas. Estes autores afirmam

que, apesar dos fatores envolvidos na seleção do oócito não estarem esclarecidos, possivelmente um ou mais oócitos contidos nestas estruturas possam ter a capacidade de ser fecundado (Reynaud *et al.*, 2009).

A prevalência destes folículos em ovários de animais adultos também está de acordo com relatos prévios para outras espécies (AL-MUFTI *et al.*, 1988; STANKIEWICZ *et al.*, 2009; REYNAUD *et al.*, 2010; SILVA-SANTOS *et al.*, 2011; LUNARDON, 2013; SILVA-SANTOS *et al.*, 2014). No presente trabalho, não houve diferença na prevalência dos folículos multioócitos nos ovários direito e esquerdo, sendo os mesmos encontrados na maioria dos ovários avaliados e principalmente nos estágios pré-antrais. Nossos resultados sugerem que os folículos multioócitos se desenvolvam progressivamente até os estágios finais de maturação, ou seja, folículos pré-ovulatórios. Esta afirmação é apoiada por estudos realizados com coelhos e suínos, onde folículos multioócitos foram encontrados em todos os estágios de desenvolvimento (AL-MUFTI *et al.*, 1988; STANKIEWICZ *et al.*, 2009). Stankiewicz *et al.* (2009) demonstraram em seus experimentos que a fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos multioócitos é possível e os mesmos apresentaram capacidade de desenvolverem-se até a fase de blastocisto, ressaltando a possibilidade de obtenção de embriões *in vitro* a partir de oócitos contidos em folículos multioócitos.

Dessa forma, os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que os folículos multioócitos estão distribuídos igualmente nos ovários de ovinos, não havendo diferença na prevalência entre os ovários direito ou esquerdo. Através da imunoexpressão dos anticorpos anti-PCNA e anti-Ki-67, verificou-se que os MOFs apresentaram atividade proliferativa semelhante à dos folículos contendo um único oócito nos diversos estágios de desenvolvimento (primordial, primário e secundário), sugerindo possível desenvolvimento destas estruturas até o estágio antral.

Referências

- ALM, H.; KUHLMANN, S.; LANGHAMMER, M.; TUCHSCHERER, A.; TORNER, H.; REINSCH, N. Occurrence of polyovular follicles in mouse lines selected for high fecundity. **Journal of Reproduction and Development**, v.56 n.4, p.449-53, 2010.
- AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÉS, J. Ph. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.82, p.15-25, 1988.
- BALCIUNIENE, J.; BARDWELL, V.J.; ZARKOWER, D. Mice Mutant in the DM Domain Gene *Dmrt4* Are Viable and Fertile but Have Polyovular Follicles. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 23, p.8984–8991, 2006.
- BEN-RAFAEL, Z.; MASTROIANNI, L.; KOPF, G.S. In vitro fertilization and cleavage of a single egg from a binovular follicle containing two individual eggs surrounded by a single zona pellucida. **Fertility and Sterility**, v.47, n.4, p.707–709, 1987.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*felis catus*). **Theriogenology**, v.66, n.1, p.5–13, 2006.
- BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v.40, p. 2-11, 2002.
- EGGAN, K., JURGA, S., GOSDEN, R., MIN, I.M., WAGERS, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. **Nature**, v.441, p.1109-1114, 2006.
- GONG, Y.; WANG, L.; WANG, H.; LI, T.; CHEN, X. The expression of NF-κB, Ki-67 and MMP-9 in CCOT, DGCT and GCOC. **Oral Oncology**, v.45, p.515–520, 2009.
- GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163 p.33–41, 2000.
- GRAHAM, C.E.; BRADLEY, C.F. Polyovular follicles in squirrel monkeys after prolonged diethylstilboestrol treatment. . **Journals of Reproduction & Fertility**, v.27, p.181-185, 1971.
- HA JR, K. Polyovular follicles and multinucleate ova in the ovaries of young rats. **The Anatomical Record**, v.142, p.25-29, 1962.

HASHIMOTO, S.; OHSUMI, K.; TSUJI, Y.; HARAUMA, N.; MIYATA, Y.; FUKUDA, A.; HOSOI, Y.; IRITANI, A.; MORIMOTO, Y. Growing porcine oocyte-granulosa cell complexes acquired meiotic competence during in vitro culture. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.2, p.379–384, 2007.

IATROPOULOS, M.J.; WILLIAMS, G.M. Proliferation markers. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.48, p.175-181, 1996.

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, n.79, p.1219-1225, 2008.

JEFFERSON, W.N.; COUSE, J.F.; PADILLA-BANKS, E.; KORACH, K.S.; NEWBOLD, R.R. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) expression and multi-oocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for estrogen-mediated and nonestrogenic actions. **Reproductive Toxicology**, v.30, p.550–557, 2010.

KIM, H.; HAYASHI, S.; CHAMBON, P.; WATANABE, H.; IGUCHI, T.; SATO, T. Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice. **Reproductive Toxicology**, v.27, p.55–62, 2009a.

KIM, H.; NAKAJIMA, T.; HAYASHI, S.; CHAMBON, P.; WATANABE, H.; IGUCHI, T.; SATO, T. Effects of Diethylstilbestrol on Programmed Oocyte Death and Induction of Polyovular Follicles in Neonatal Mouse Ovaries. **Biology of Reproduction**, v.81 n.5, p.1002-1009, 2009b.

LIU, S.C.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**, v.36, p.145-151, 2000.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v.56, p.223–236, 1999.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, n.57, p.1467-1483, 2002.

LUNARDON, N.T. **Comparação da população de folículos pré-antrais e frequência de folículos multiócitos de cadelas pré-púberes e adultas de pequeno e médio porte.** 2013. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N.L.; McNATTY, K.P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.251-262, 1999.

McDOUGALL, K.; HAY, M.A.; GOODROWE, K.L.; GARTLEY, C.J.; KING, W.A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, n.51, p.25-31, 1997.

MEER, S.; GALPIN, J.S.; ALTINI, M.; COLEMAN, H. AND ALI, H. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.95, p.213-221, 2003.

MICLAUS V.; GROZA, I.; OANA, L. Domestic cat (*Felis catus*) polyovular follicles. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca**, v.64, p.1-2, 2007.

MYOUNG, H.; KIM, M.J.; LEE, J.H.; OK, Y.J.; PAENG, J.Y.; YUN, P.Y. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, p. 1005–1010, 2006.

OKTAY, K.; SCHENKEN, R.S.; NELSON, J.F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. **Biology of Reproduction**, v.53, p.295-301, 1995.

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

REYNAUD, K.; VIARIS, D.E.; LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**, v.72, p.1120–1131, 2009.

REYNAUD, K.; HALTER, S.; TAHIR, Z.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. Les follicules polyovocytaires. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.38, p.395–397, 2010.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, S.H.; SILVA, J.R.; MATOS, M.H.; LUCCI, C.M.; BAO, S.N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249–263, 2006.

SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G.S.; MORA, J.M.; MOBBERLEY, M.; RYDER, T.A.; BAITHUN, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v.121, p.3890-3900, 2008.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, p.1051–1057, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.; SILOTO, L.S.; SANTOS, G.M.G.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T.N. AND SENEDA, M.M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.48–51, 2014.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v.123, p.185–202, 2002.

STANKIEWICZ, T.; BLASZCZYK, B.; UDALA, J. A Study on the Occurrence of Polyovular Follicles in Porcine Ovaries with Particular Reference to Intrafollicular Hormone Concentrations, Quality of Oocytes and their in vitro Fertilization. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.38, p.233–239, 2009.

STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**, v.107, p. 1127–1140, 2011.

TELFER, E.; GOSDEN, R.G. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). **Journals of Reproduction & Fertility**, v.81, p.137–147, 1987.

TINGEN, C.; KIM, A.; WOODRUFF, T.K. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.12, p.795–803, 2009.

TOMÁNEK, M., CHRONOWSKA, E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.44, n.4, p.269-274, 2006.

WANDJI, S.A.; SRSEI, V.; VOSS, A.K.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, V. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v.78, p.1153-1161, 2008.

ZEILMAKER, G.H.; ALBERDA, A.T.; VAN GENT, I. Fertilization and cleavage of oocytes from a binovular human ovarian follicle: a possible cause of dizygotic twinning and chimerism. **Fertility and Sterility**, v.40, v.6, p.841-843, 1983.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados nos permitem as seguintes conclusões:

- Folículos multioócitos primordiais apresentam diâmetro maior que os folículos primordiais contendo um oócito, entretanto, seus respectivos oócitos apresentam diâmetros semelhantes, sugerindo não haver competição ou dominância entre os oócitos contidos em folículos multioócitos;
- Houve correlação entre o tamanho, volume e peso dos ovários, quantidade de corpos lúteos e a população folicular ovariana, contudo, nenhum destes parâmetros apresentou correlação com a quantidade de folículos multioócitos nos ovários;
- A prevalência de folículos multioócitos em ovários de ovinos foi de 97,22% (70/72) para a imunomarcação de PCNA, não havendo diferença na prevalência destas estruturas entre ovários direitos e esquerdos;
- A imunoexpressão dos anticorpos anti-PCNA e anti-Ki-67 revelou que os folículos multioócitos apresentaram atividade proliferativa semelhante à dos folículos contendo um único oócito nos diversos estágios de desenvolvimento (primordial, primário e secundário), sugerindo possível desenvolvimento destas estruturas até o estágio antral.