

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**HISTOMORFOMETRIA OVARIANA DE FELINOS**  
**DOMÉSTICOS (*Felis catus*) EM DISTINTAS FAIXAS**  
**ETÁRIAS**

**ISADORA RESENDE DE CARVALHO**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**HISTOMORFOMETRIA OVARIANA DE FELINOS**  
**DOMÉSTICOS (*Felis catus*) EM DISTINTAS FAIXAS**  
**ETÁRIAS**

**Isadora Resende de Carvalho**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto**

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Junho de 2013**

C331m Carvalho, Isadora Resende de  
Histomorfometria ovariana de felinos domésticos (*Felis catus*) em distintas faixas etárias / Arnold Barbosa de Oliveira. -- Jaboticabal, 2013

xvi, 33 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Marion Burkhardt de Koivisto

Banca examinadora: Wilter Ricardo Russiano Vicente, Cássia Maria Barroso Orlandi

Bibliografia

1. Gatos domésticos. 2. Ovário-gata. 3. Folículo-reprodução animal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.612.621:636.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**ISADORA RESENDE DE CARVALHO** – Natural de Jataí - GO, nascida em 15 de dezembro de 1985; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina em janeiro de 2005, concluindo-o em dezembro de 2009. Em março de 2011 iniciou o curso de mestrado em Reprodução Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, concluindo-o em junho de 2013.

**Sem sonhos, a vida é uma manhã sem orvalhos, um céu sem estrelas,  
um oceano sem ondas, uma vida sem aventura, uma existência sem sentido.**

**(Augusto Cury)**

**Dedico esta dissertação aos  
meus pais Renato e Norma,  
minhas irmãs Marília e Emiliana e  
meu noivo Douglas**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande agradecimento por me proporcionar A VIDA e poder desfrutá-la em paz e feliz ao lado das pessoas que eu amo.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marion Burkhardt de Koivisto pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e pela constante colaboração.

As secretárias Claudete e Sílvia e aos funcionários Ezau, Clélio e Marta do Departamento de Reprodução e Obstetrícia Animal Unesp/Araçatuba pela colaboração em vários momentos de nosso trabalho.

Ao Departamento de Patologia Animal, em especial a Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisele Fabrino Machado pela atenção, apoio e contribuição para o projeto, ao técnico Lorinaldo pela ajuda, amizade, e grande colaboração na montagem das lâminas. A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cecília Rui Luvizotto pelas observações, sugestões e grande contribuição nos resultados do estudo.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina Maria Rodrigues Monteiro pela atenção, ajuda e contribuição para o trabalho, à técnica Marta pelo os ensinamentos, atenção e colaboração com os processos histológicos e montagem das lâminas. Ao Prof<sup>º</sup>. Dr. Roberto Carvalhal pelo auxílio na identificação das idades dos animais por meio da arcada dentária.

Ao Prof<sup>º</sup>. Dr. Guilherme de Paula Nogueira pela atenção e contribuição nas dosagens hormonais, á técnica Devani pela ajuda e colaboração na execução da técnica para dosagem hormonal de progesterona.

Ao Prof<sup>º</sup>. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente e a Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Maria Rita Pacheco pelas sugestões oferecidas ao nosso trabalho e gentileza na participação na banca no meu exame de Qualificação.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cássia Maria Barroso Orlandi e ao Prof<sup>º</sup>. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente pela atenção, capricho e acréscimo dados à dissertação.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sílvia Helena Venturoli Perri sempre muito prestativa na elaboração da estatística e compilações dos nossos resultados.

Aos meus pais Renato e Norma, irmãos Marília e Emiliana pela dedicação, carinho, amor, atenção e cuidado em todos os momentos de minha vida, por sempre me apoiarem e me ajudarem em todas as minhas decisões e por serem meus eternos amigos.

Ao meu querido noivo Douglas agradeço a compreensão nos momentos difíceis e de ansiedade e pelo grande carinho, amor e amizade.

Aos Pós-graduandos Aline Cogo, Diego Yamada e a médica veterinária Priscila Santos Souza pela ajuda e colaborações durante as cirurgias de Ovariosalpingo-histerctomia (OSH) em vários finais de semana.

As minhas queridas amigas Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaina Torres Carreira e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maricy Apparício Ferreira, pela amizade, carinho, momentos de alegria, companheirismo, grande ajuda e por várias contribuições e sugestões oferecidas ao nosso trabalho. Ao meu amigo Petrônio Gomes, pela ajuda, amizade, companheirismo e muita contribuição com o projeto. A graduanda Daniela Scantamburlo Denadai pelo auxílio e contribuição essencial em todo trabalho. As minhas amigas Andrea Nobre e Natália Souza pelo companheirismo, amizade e carinho. O meu muito obrigado por tudo de todo o coração.

À minha queridíssima anestesista Joana Zafalon Ferreira, pela amizade, apoio, ajuda, pelos vários finais de semana de muito trabalho, pela dedicação, por momentos de alegrias, meus sinceros agradecimentos. Você é uma amiga especial.

À minha querida “Personal tudo” Bruna Helena Kipper, companheira, pessoa querida que tem uma maneira especial de lidar com as pessoas. Gostei tanto de te conhecer, sempre disposta a ajudar, sempre tão prestativa, vou sentir falta das nossas conversas, dos nossos chimarrões e de nossas idas ao centro. Você é uma amiga maravilhosa.

À minha queridíssima amiga Juliane Teramachi Trevizan, minha vizinha, irmã, que me acompanhou e me ajudou desde o primeiro dia que cheguei aqui em Araçatuba, minha “faz tudo”, o que eu será de mim sem essa menininha, ou melhor, sem essa mulher? Muito obrigada por fazer parte da minha vida, da



minha história e por proporcionar tantos momentos de alegria, por me ajudar em momentos de tristeza e por abrir meus olhos em momentos difíceis. Obrigada por ser essa amiga tão especial com esse coração enorme e cheio de amor para dar. Vou carregar-te no meu coração para onde eu for. Desejo-te muito sucesso e que Deus ilumine seus caminhos.

Ao meu sogro Antônio Paulo e minha sogra Edilze, pela atenção, carinho, amizade e grande apoio em todos os momentos necessários, por serem pessoas queridas, especiais e que sempre tiveram muito presentes em minha vida.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>I INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
2.1. Animais.....	8
2.2 Grupos Experimentais.....	8
2.3. Citologia vaginal e dosagem hormonal.....	8
2.4. Avaliação Histológica .....	11
2.5. Análises Morfométricas .....	11
<b>III. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>12</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
4.1. Diâmetro, Área e Perímetro.....	14
4.2. Relação de Crescimento do folículo e do oócito.....	18
4.2.1. Folículo Primordial.....	18
4.2.2. Folículo Primário Unilaminar.....	19
4.2.3. Folículo Primário Multilaminar ou Pré- Antral. ....	20
4.2.4 Folículo Secundário ou Antral.....	21
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>VI. CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>28</b>
<b>VIII. APÊNDICE.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1</b> Grupos experimentais determinados pela idade (anos) das gatas, média ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e idade máxima e mínima dos animais.....	8
<b>Tabela 2</b> Valores médios ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e mediana (Md) do diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) de folículos primordiais (P, n= 318), primários unilaminares (PU, n= 271), primários multilaminares (PM, n= 271), secundários (SE, n= 124) e pré-ovulatórios (PO, n= 55), de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 (4-12 meses), Grupo 2 ( >1-6 anos) e Grupo 3 (> de 6 anos).....	15
<b>Tabela 3</b> Valores médios ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e mediana (Md) da área ( $\mu\text{m}^2$ ) de folículos primordiais (P, n= 318), primários unilaminares (PU, n=271), primários multilaminares (PM, n= 271), secundários (SE, n= 124) e pré-ovulatórios (PO, n= 55) de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 (4-12 meses), Grupo 2 (>de 1-6 anos) e Grupo 3 (> de 6 anos).....	16
<b>Tabela 4</b> Valores médios ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e mediana (Md) do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) de folículos primordiais (P, n= 318), primários unilaminares (PU, n= 271), primários multilaminares (PM, n= 271), secundários (SE, n=124) e pré-ovulatórios (PO, n= 55) de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 (4-12 meses), Grupo 2 (> de 1-6 anos) e Grupo 3 (> de 6 anos).....	17

## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>Figura1.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61, das células do epitélio vaginal observadas na citologia vaginal de gatas domésticas. (A) Célula intermediária, aumento de 400X, (B) células parabasais, aumento 200X, (C) célula superficial nucleada, aumento de 400X e (D) célula superficial nucleada, aumento de 400X.....	10
<b>Figura2.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 da citologia vaginal de gatas domésticas classificadas em fases do ciclo estral. (A) estro, aumento de 200X, (B e C) não estro, sendo (B) diestro, aumento de 100X e (B) anestro, aumento de 200X.....	10
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x do diâmetro máximo e mínimo de um folículo primário multilaminar de uma gata doméstica. (A) Diâmetro folicular e (B) Diâmetro oocitário.....	12
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos primordiais. A: (a) oócito, (b) células da pré-granulosa.....	13
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos primários unilaminares. A: (a) zona pelúcida em formação, (b) células da granulosa.....	13
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos primários multilaminares. A: (a) células da granulosa, (b) Início da formação das tecas foliculares.....	13
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 200x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos secundários. A: (a) antro, B: (b) células da granulosa, C: (c) Teca externa.....	14

<b>Figura 8.</b> Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 100x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos pré-ovulatórios. A: (b) corona radiata, B: (a) cumulus oophorus, (c) cavidade antral e C: (d) células da granulosa.....	14
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 318 folículos primordiais, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	18
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitária, em $\mu\text{m}^2$ , de 318 folículos primordiais, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	18
<b>Figura 11.</b> Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 318 folículos primordiais, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	19
<b>Figura 12.</b> Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários unilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	19
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitária, em $\mu\text{m}^2$ , de 271 folículos primários unilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	19
<b>Figura 14.</b> Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários unilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	20
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários multilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	20
<b>Figura 16.</b> Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitária, em $\mu\text{m}^2$ , de 271 folículos primários multilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	20
<b>Figura 17.</b> Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários multilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	21
<b>Figura 18.</b> Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 124 folículos secundários, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	21
<b>Figura 19.</b> Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitário, em $\mu\text{m}^2$ , de 124 folículos secundários, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	21
<b>Figura 20.</b> Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em $\mu\text{m}$ , de 124 folículos secundários, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....	22

**Figura 21.** Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 860 folículos pré-antrais (318 primordiais, 271 primários unilaminares e 271 primários multilaminares), e entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 179 folículos antrais (124 secundários e 55 pré-ovulatórios), de 17 gatas de diferentes faixas etárias.....

**LISTA DE ABREVIATURAS**

OSH= Ovariosalpingo-histerectomia

pg= Picogramas

FIV= Fertilização *in vitro*

MIV= Maturação *in vitro*

FSH= Hormônio folículo estimulante

LH= Hormônio luteinizante

H.E= Hematoxilina Eosina

r= coeficiente de correlação

r<sup>2</sup>= coeficiente de determinação

µm= micrometros

X = Média

SEM= Erro padrão da média

Md= Mediana

P= Primordial

PU= Primário unilaminar

PM= Primário multilaminar

SE= Secundário

PO= Pré-ovulatório

pH= Potencial hidrogeniônico

°C= Graus centígrados

= menor ou igual

= maior ou igual

> = maior

< = menor

P<sub>4</sub>= Progesterona

IM = Intramuscular

IV = Intravenoso

## HISTOMORFOMETRIA OVARIANA DE FELINOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) EM DISTINTAS FAIXAS ETÁRIAS

**RESUMO-** O objetivo desse estudo foi avaliar a histologia e morfometria de ovários de 17 gatas classificadas de acordo com as idades G1 (4-12 meses); G2 (1-6 anos) e G3 (> 6 anos). Após realização da ovariosalpingo-histerectomia os ovários foram fixados, processados rotineiramente para a inclusão em parafina e corados com Hematoxilina-eosina. Os parâmetros morfométricos analisados foram: diâmetro ( $\mu\text{m}$ ), área ( $\mu\text{m}^2$ ) e perímetro ( $\mu\text{m}$ ) dos folículos e respectivos oócitos de diferentes tipos de folículos. A relação entre o crescimento do folículo e do oócito foi analisada. Os procedimentos estatísticos utilizados foram ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey e as medianas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn ( $P < 0,05$ ). Ao todo foram 1039 folículos analisados histologicamente e houve diferença significativa nos diâmetros, áreas e perímetros foliculares e oocitários de folículos primordiais e primários unilaminares. Observou-se padrão bifásico para o crescimento do folículo e do oócito. Conclui-se que as gatas jovens obtiveram maiores valores em folículos primários unilaminares em relação às idosas. Sugere-se que o “pool” de folículos pequenos remanescentes e seus respectivos oócitos diminuem com a idade e que na fase senil esses folículos são de baixa qualidade, quando comparados ao início da vida reprodutiva. Estudos com morfometria do ovário poderão auxiliar pesquisas de tecnologias reprodutivas assistidas, como por exemplo, a maturação *in vitro* (MIV), já que o tamanho e a qualidade dos folículos e oócitos podem afetar a MIV em felinos domésticos. Adicionalmente, esses estudos poderão auxiliar na preservação de felinos selvagens em extinção.

**Palavras chave:** Gata, ovário, folículo, oócito.



## **OVARIAN HISTOMORPHOMETRY OF DOMESTIC FELINE (*Felis catus*) IN DIFFERENT AGES**

**ABSTRACT-** The aim of this study was to evaluate the histology and morphometry of ovaries of 17 cats classified according to ages G1 (4-12 months), G2 (1-6 years) and G3 (>6 years). After ovariosalpingohysterectomy the ovaries were fixed in paraformaldehyde 5% prior to embedding in paraffin and staining with haematoxylin-eosin. The morphometric parameters analyzed were: diameter ( $\mu\text{m}$ ), area ( $\mu\text{m}^2$ ) and perimeter ( $\mu\text{m}$ ) of follicles and oocytes from different follicles types. The relationship between the growth of the follicle and oocyte was analyzed. The statistical analysis were ANOVA and the means were compared by Tukey test and medians using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons ( $P < 0.05$ ). A total of 1039 follicles were analyzed histologically and there were significant difference in follicular and oocyte diameter, area and perimeter of primordial and primary unilaminar follicles. It was observed a biphasic pattern for the growth of the follicle and oocyte. In conclusion, young queens had higher values in primary unilaminar follicles than older queens. It is suggested that the remaining pool of small follicles and their oocytes decreases with age and that follicles of older queens has low quality compared to the beginning of reproductive life. Ovarian morphology studies may assist in assisted reproductive technologies such as *in vitro* maturation (MIV), since it is known that the size and quality of follicles and oocytes may affect the MIV in domestic queens. Additionally, it may assist in the preservation of endangered wild felines.

**.Key words:** cat, ovary, follicle, oocyte.

## I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A família dos felinos (Felidae) é composta por 37 espécies e o gato doméstico é a única não ameaçada de extinção. A preservação dessas espécies ameaçadas é realizada por meio da reprodução em cativeiros, zoológicos e criadouros e são importantes para manutenção das linhagens genéticas e biodiversidade. Alguns felinos em cativeiro se reproduzem com facilidade, já outros não, devido à falta de informação fisiológica da espécie (WILDT et al, 1986; BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

A gata doméstica é modelo experimental importante e necessário para a produção de tecnologias reprodutivas assistidas. Métodos confiáveis para a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) têm sido desenvolvidos por meio da utilização de oócitos obtidos de gatas domesticadas (WLODARCZYK et al, 2009). O estudo da foliculogênese ovariana proporciona melhor compreensão dos princípios básicos da reprodução podendo ser útil na preservação de felinos em extinção (CARRIJO Jr et al, 2010).

As gatas são poliéstricas sazonais, de ovulação induzida. (CONCANNON et al, 1980). Na ausência de cópulas as fêmeas, na estação reprodutiva, geralmente entram no estro a cada duas ou três semanas. O anestro prolongado é resultado de mudanças sazonais resultantes da diminuição do dia (LOFSTEDT, 1982; BANKS, 1986;).

A puberdade ocorre geralmente entre cinco a dez meses e seu início é influenciado pelo peso corporal e também pela estação do ano (TSUTSUI e STABENFELDT, 1993; ROMAGNOLI, 2003). A idade ideal para reprodução é de aproximadamente 1,5 a 7 anos, pois as gatas jovens (até 1,5 anos) e idosas apresentam ciclos irregulares (BANKS, 1986). Além disso, gatas idosas (> 7 anos) possuem ninhadas menores, maiores índices de aborto e defeitos congênitos (FELDMAN e NELSON, 2004).

Os estágios do ciclo estral das gatas incluem proestro, estro, interestro, diestro e anestro (BANKS, 1986; JOHNSTON et al, 2001).

O pró-estro dura em média 2 dias. Durante essa fase ocorrem mudanças no comportamento das gatas, porém, ainda não permitem a cópula com o macho (TSUTSUI e STABENFELDT, 1993; FELDMAN e NELSON, 2004;). Nesse período observa-se o crescimento folicular e aumento da síntese de estradiol pelas células da granulosa (SHILLE, et al, 1979; JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004), e consequentes alterações na morfologia das células do epitélio vaginal (MILLS et al, 1979).

O estro consiste no período de receptividade sexual e cópula, que dura em média 7,5 dias (2-19). Observam-se mudanças de comportamento como vocalização constante, fricção em vários objetos e posição de lordose (ETTINGER e FELDMAN, 2004, JOHNSTON et al, 2001). Após a cópula, ocorre a liberação de LH e possível ovulação que é influenciada pelo dia da fase folicular, número e frequências de cópulas (BANKS, 1986). Na ausência de acasalamento ou ovulação espontânea, as gatas entram no período de interestro, que dura média de 10 a 14 dias (0-20 dias). Nessa fase as concentrações de estrógenos geralmente se encontram em níveis basais, menos que 20 pg/ml (SCOTT e LLOYD-JACOB, 1959; WILDT, 1980; ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Após o estro, as gatas que apresentarem ovulação induzida entram na fase do diestro onde ocorre a formação do corpo lúteo que é responsável pela secreção de progesterona. Esse período dura aproximadamente 60 dias em gatas gestantes. Entretanto, quando ocorre o estímulo, mas não há fertilização, as gatas entram no período de pseudogestação que dura em média 40 dias. O anestro é caracterizado pela ausência sazonal de ciclicidade ovariana que ocorre durante os períodos de pouca luminosidade. Nessa fase, as gatas estão sexualmente inativas e as concentrações de estradiol e progesterona se encontram em níveis basais (BANKS e STABENFELDT, 1983; FELDMAN e NELSON, 1996).

As células epiteliais da vagina das gatas se modificam na presença do hormônio estradiol e podem ser usadas para acessar o estágio do ciclo estral (SHILLE et al, 1979). A citologia vaginal é realizada por meio de swab vaginal estéril pré-umedecido com água destilada ou solução salina. Após esfregaço as

lâminas podem ser coradas pela metodologia de Giemsa ou Wright's e são analisadas em microscopia óptica pela contagem de 100 células. Dependendo da fase do ciclo estral quatro tipos de células epiteliais são encontradas: parabasais, intermediárias, superficiais nucleadas e superficiais anucleadas. (BANKS, 1986; JOHNSTON et al, 2001).

Shille et al (1979) estudaram as concentrações plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol em relação ao comportamento estral e queratinização do epitélio vaginal de gatas domésticas. Concluíram que durante o primeiro ao quarto dia da fase folicular a porcentagem de células totalmente queratinizadas aumentou de 5 para 40%, e que as células com queratinização parcial, ou seja, com núcleo intacto (células superficiais) diminuíram de 45 para 6%, progressivamente.

A foliculogênese consiste no processo de formação, crescimento e maturação folicular, que inicia com o folículo primordial e finaliza no estágio pré-ovulatório (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). A foliculogênese ocorre simultaneamente à oogênese, quando o oócito se encontra entre as fases de prófase I e metáfase II (na maioria das espécies), e pode ser dividida em duas fases: a fase pré-antral, que é caracterizada pela ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários e, a fase antral, que caracteriza o período de crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (MARTINS et al, 2008).

A oogênese que se inicia no período pré-natal e finaliza após o fim da maturidade sexual, é marcada pela sequência de transformações das células germinativas primitivas (oogônias) em oócitos maduros, dividindo-se em três fases: multiplicação ou proliferação, crescimento e maturação. Durante a fase de multiplicação, as células germinativas se multiplicam por mitose e originam as oogônias. Posteriormente, as oogônias iniciam a primeira divisão meiótica, considerada a fase de crescimento sendo interrompida na prófase I. No final dessa fase, as oogônias se transformam em oócitos primários e se mantêm por bloqueio da divisão até a puberdade. A fase de maturação ou reinício do processo ocorre quando o oócito primário completa a primeira divisão meiótica, originando o oócito

secundário e o primeiro corpúsculo polar. Posteriormente, o oócito sofre a segunda divisão meiótica, com a formação segundo corpúsculo polar e só irá completar a maturação caso houver fecundação (HIRSFIELD, 1991; MOORE e PERSAUD, 2004)

O ovário se divide em duas zonas diferentes, o córtex e a medula. Sua estrutura varia com a espécie, idade e fases do ciclo estral, possuindo função exócrina (produção de oócitos) e endócrina (síntese de hormônios esteroides: estrógeno e progesterona). O córtex é a zona periférica localizada abaixo da túnica albugínea, composta por folículos em desenvolvimento, corpos lúteos e células do estroma. Já a medula está localizada na área interna do ovário e contém nervos, grande quantidade de vasos sanguíneos e vasos linfáticos. (PRIEDKALNS, 1993; SAMUELSON, 2007).

O folículo ovariano é composto por um oócito cercado por uma camada de células epiteliais (GARTNER e HEATT, 2001) e sua maturação é estimulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) secretado pela glândula pituitária anterior (YOUNG e HEATT, 2001). O folículo passa por várias fases de maturação: folículo primordial, primário, secundário e folículo maduro (de Graaf) (GARTNER e HEATT, 2001).

Os folículos primordiais são formados no período de desenvolvimento fetal e são constituídos por ovócito primário circundado por uma única camada de células foliculares (células da granulosa). Com o desenvolvimento as células foliculares se dividem por mitose formando uma única camada de células cubóides, caracterizando o folículo primário unilaminar. Após a formação da zona pelúcida, da teca interna, e aumento nas camadas de células da granulosa, o folículo é denominado primário multilaminar ou folículo pré-antral. À medida que os folículos crescem certa quantidade de líquido, chamado líquido folicular, se acumula entre as células granulosas, formando o antro folicular e o folículo passa a ser chamado de secundário ou pré-antral. Com o completo desenvolvimento das tecas, formação do *cumulus oophorus*, que serve de apoio para o ovócito, da *corona radiata*, que envolve todo o ovócito e pela presença do antro folicular, esse

folículo passa a ser chamado de folículo pré-ovulatório ou folículo de Graaf (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2011).

A ovulação consiste na ruptura da parede do folículo dominante e consequente liberação do ovócito, que deixa o ovário rodeado pela zona pelúcida, *corona radiata* e com pequeno volume de fluido folicular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2011). Durante toda a vida do animal, apenas centenas de folículos primordiais poderão atingir a ovulação, os restantes são interrompidos em várias fases de desenvolvimento, resultando em degeneração folicular, conhecida como atresia folicular (SAMUELSON, 2007).

Estudos sobre o desenvolvimento folicular em ovários de animais domésticos, concluíram que os mesmos se desenvolviam a partir de um pool de folículos primordiais inativos existentes durante todas as fases reprodutivas, sendo o número de folículos e seu padrão de crescimento espécie-específicos. Sabe-se ainda que esse desenvolvimento, que ocorre em padrão de ondas durante a fase folicular, também varia entre as espécies (EVANS, 2003). Pesquisa realizada em várias espécies de mamíferos verificou que durante os estágios iniciais de desenvolvimento o crescimento dos folículos é lento quando comparado ao significativo crescimento folicular após a formação do antro (FORTUNE, 1994).

Westergaard et al (2007) avaliaram as características morfométricas da transição dos folículos primordiais para primários em humanos e sua relação com a idade. Constataram redução nos diâmetros foliculares e oocitários em mulheres acima de 36 anos. Desta forma, sugeriram que as mudanças observadas com a idade poderiam estar relacionadas à qualidade reduzida do pool de folículos restantes no ovário.

Hewitt e England (1998) estudaram o efeito da idade em cadelas e o tamanho dos oócitos submetidos à maturação *in vitro* (MIV) e verificaram que estruturas com diâmetros inferiores a 100µm possuem material nuclear menor, portanto, menor competência meiótica. Outro estudo verificou que oócitos de cadelas adultas apresentam maior número de folículos secundários e terciários com medidas acima de 100µm e que essa faixa etária seria ideal para

manipulação de oócitos, pois apresentam capacidade meiótica maior (DIAGONE et al, 2008).

A foliculogênese em felinos se inicia durante a segunda ou terceira semana de desenvolvimento fetal (PETERS e NATTY, 1980). O crescimento folicular começa com a ativação do “pool” de folículos quiescentes e subsequente formação dos folículos primários, secundários, terciários e pré-ovulatório (RUSSE, 1983). A gata doméstica representa modelo ideal para estudar o desenvolvimento dos folículos devido à disponibilidade de folículos em todos os estágios, principalmente os primordiais que são observados em todas as idades (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Em felinos, os folículos primordiais são os menores e consistem de oócito variando de 20 a 30µm de diâmetro, onde 1 a 8 células achatadas ou células da pré-granulosa o circundam. Folículos primários contêm oócitos que variam de 30 a 50µm de diâmetro e uma única camada de células da granulosa cúbica. Os folículos secundários variam de tamanho devido a múltiplas camadas de células da granulosa, variando de 100 a 400µm e contêm oócitos com diâmetro de 40 a 75µm. É nessa fase que inicia a formação das células da teca. Já em pequenos folículos antrais os diâmetros são similares ao dos folículos secundários, aumentando com o acúmulo de fluido folicular, variando de 300-1000 µm, com oócito medindo aproximadamente 75 a 90µm. Nessa fase são observadas duas a três camadas de células da teca circundando os folículos. Por fim, os grandes folículos antrais variam de 2 a 3 mm de diâmetro e contêm camadas de células da granulosa murais e do *cumulus* intactas, como também, muitas camadas de células da teca, antro e oócito de aproximadamente 85-100µm de diâmetro (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Reynaud et al (2009) estudaram o crescimento de todos os folículos e oócitos em ovários de felinos domésticos, qualitativamente e quantitativamente em microscopia de luz e observaram que cada fêmea apresentava média de 19,6 folículos. Quando os folículos alcançaram diâmetro de 160 – 200µm, verificaram a formação do antro e constataram que nesta fase os oócitos atingiram 90% do seu

diâmetro final. Foi observado padrão bifásico para o crescimento dos folículos e oócitos, ou seja, o crescimento do ócito era mínimo após a formação do antro, comparado com o significativo crescimento folicular.

Carrijo Jr et al (2010) avaliaram morfometricamente os folículos pré-antrais de gatas adultas (2-4 anos) por meio da microscopia de luz e estimaram a média da população ovariana em 37,8% folículos pré-antrais por ovário, sendo 87% folículos primordiais, 10,4% folículos primários e 2,3% folículos secundários. Quando estudaram a ultra-estrutura verificaram o início da formação da zona pelúcida em folículos primários. Já em oócitos de folículos secundários, observaram conglomerados de organelas associados ao alinhamento periférico de grânulos corticais evidenciando o início do processo de maturação nessa espécie.

Estudo recente em gatas pré-púberes e gatas sexualmente maduras avaliou a condição ovariana e crescimento folicular na maturação *in vitro* (MIV). Verificou-se que em gatas maduras, independente da fase ovariana, os folículos antrais crescem de modo similar até 2000 $\mu$ m de diâmetro e até 1200 $\mu$ m de diâmetro em gatas pré-púberes. Os pesquisadores concluíram que tanto o tamanho e qualidade dos folículos e oócitos poderiam afetar a MIV e seu posterior desenvolvimento. Observaram também que gatas maduras possuem capacidade de MIV maior quando os oócitos são oriundos de folículos maiores (1200-2000 $\mu$ m de diâmetro), o que não acontece em gatas pré-púberes onde essa mesma capacidade foi observada em oócitos derivados de folículos pequenos (400-800 $\mu$ m de diâmetro) (UCHIKURA et al, 2011).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os parâmetros histomorfométricos do crescimento folicular em gatas de diferentes idades. O estudo foi conduzido analisando o grau de desenvolvimento dos folículos, seu diâmetro, área e perímetro como de seus respectivos oócitos.



## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais

Foram estudadas 17 fêmeas da espécie felina, sem raça definida, consideradas híidas após serem submetidas aos exames físico e clínico, não prenhes, sem histórico de problemas reprodutivos. Os animais inclusos no experimento foram provenientes do setor de Obstetrícia Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, câmpus de Araçatuba – Unesp.

### 2.2 Grupos Experimentais

Os animais foram agrupados de acordo com a idade e distribuídos em três grupos, sendo: Grupo 1- jovens (4-12 meses), com 6 animais, Grupo 2-adultas (1-6 anos), com 6 animais e Grupo 3-idosas ( > 6 anos), com 5 animais. A faixa etária foi estimada por meio da análise da arcada dentária (ISHIZAKI et al., 2006).

**Tabela 1.** Grupos experimentais determinados pela idade (anos) das gatas, média, erro padrão da média e idade máxima e mínima dos animais.

Grupo	n° animais	Idade (anos)		
		Média	Mínima	Máxima
Jovens (G1)	6	0,78±0,1	0,4	1
Adultas (G2)	6	2,81±0,5	1,4	5
Idosas (G3)	5	8,00±0,9	6	11

### 2.3 Citologia vaginal e dosagem hormonal

Para caracterizar a fase do ciclo reprodutivo foi realizada primeiramente a citologia vaginal para prévia avaliação e posteriormente a dosagem hormonal de progesterona (P<sub>4</sub>). Ambas foram realizadas durante o período transoperatório da cirurgia de ovariosalpingo-histerectomia (OSH), portanto, todas as gatas estavam anestesiadas de acordo com protocolo estabelecido pelo Projeto de Esterilização de Cães e Gatos (PROEX) da Unesp, campus de Araçatuba (Anexo 1).

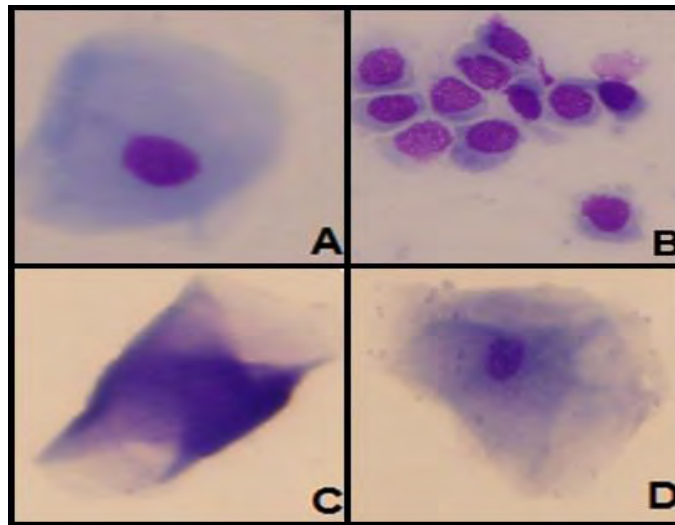
A colheita do material para exames citovaginais foi realizada com auxílio de “swab” vaginal estéril pré-umedecido com solução fisiológica. Após o esfregaço as lâminas foram coradas com o Kit panótico rápido e analisadas por meio da microscopia óptica de luz (Olympus BX61).

As lâminas foram avaliadas de acordo com a porcentagem e morfologia das células do epitélio vaginal (TONIOLLO et al, 1995). Foi avaliado um total de 100 células por lâmina em aumentos de (100X, 200X e 400X). As células observadas foram: superficiais nucleadas, superficiais anucleadas, intermediárias e parabasais. De acordo com os resultados da citologia as gatas foram classificadas em dois grupos: não-estro e estro.

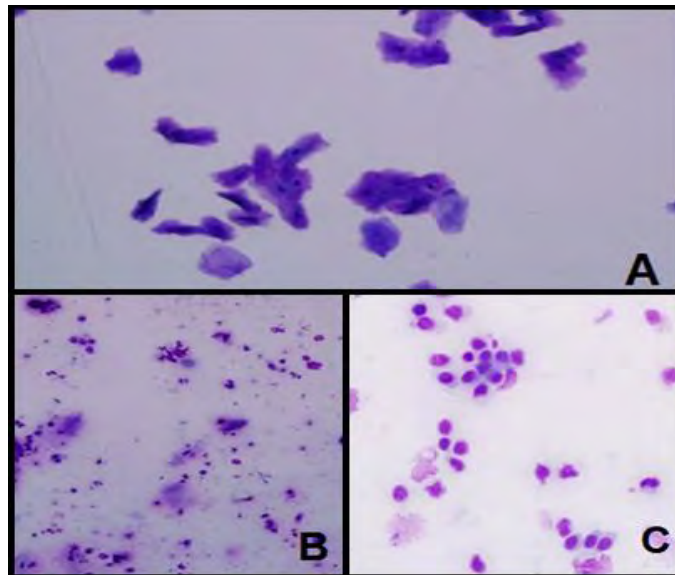
A dosagem hormonal foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da UNESP, campus de Araçatuba por meio do teste “Coat-A-Count progesterone”<sup>1</sup>. A progesterona Coat-A-Count é um radioimunoensaio de fase sólida marcado com I<sup>125</sup> designado para a dosagem quantitativa direta da progesterona em soro ou plasma.

A colheita de sangue foi realizada durante o período transoperatório por meio da venopunção. As amostras de  $\pm 3$  mL foram centrifugadas e armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para realização do procedimento as amostras foram expostas a temperatura ambiente ( $15-28^{\circ}\text{C}$ ) e agitadas suavemente. Os tubos lisos de polipropileno (não revestidos), os com anticorpos de progesterona e os revestidos adicionais para os controles, foram rotulados em duplicata. Posteriormente os calibradores, os controles e as amostras dos animais foram pipetados nos tubos pré-preparados. A progesterona foi adicionada em todos os tubos e estes foram misturados em vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 3 horas em temperatura ambiente ( $15-28^{\circ}\text{C}$ ), decantadas vigorosamente e contadas por contador gama durante 1 minuto.

De acordo com as concentrações hormonais de progesterona ( $P_4$ ) (JOHNSTON et al, 2001) (Anexo 2) e por meio da citologia vaginal (TONIOLLO et al, 1995), os animais foram classificados no período de não-estro.



**Figura1.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 de células do epitélio vaginal observadas na citologia vaginal de gatas domésticas. (A) Célula intermediária, aumento de 400X, (B) células parabasais, aumento 200X, (C) célula superficial nucleada, aumento de 400X e (D) célula superficial nucleada, aumento de 400X.



**Figura2.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 da citologia vaginal de gatas domésticas classificadas em fases do ciclo estral. (A) estro, aumento de 200X, (B e C) não-estro, sendo (B) diestro, aumento de 100X e (B) anestro, aumento de 200X.

## **2.4. Avaliação Histológica**

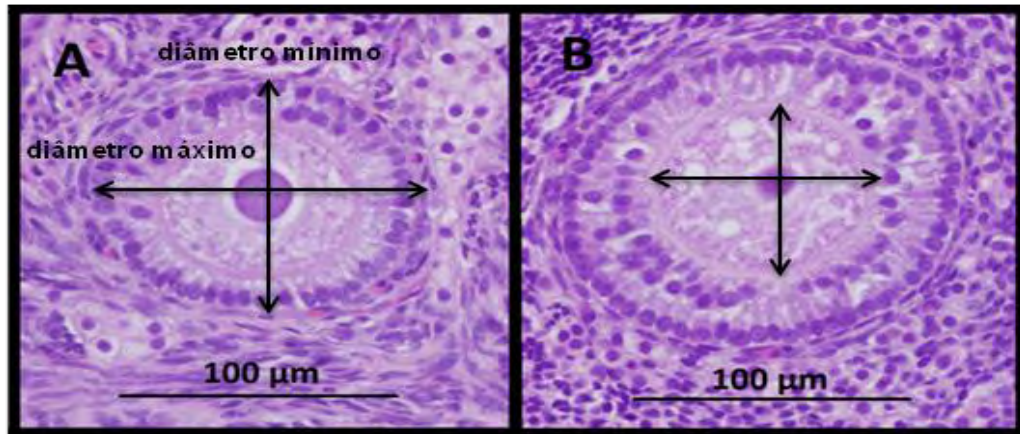
Os ovários foram fixados em solução de paraformaldeído 5% pH 7,2-7,4 (tamponada) por 24 horas e as amostras incluídas em paraplast<sup>TM</sup>. Os cortes histológicos de aproximadamente 5µm de espessura foram submetidos à coloração rotineira com Hematoxilina e Eosina e examinados ao microscópio de luz (Olympus BX61). Todos os folículos foram contados e categorizados em dois grupos, não-atréticos e atréticos, seguindo o critério morfológico estabelecido por BLONDI et al (1996).

Os folículos não atréticos foram aqueles com a membrana da granulosa intacta e a presença de poucos núcleos picnóticos ( 5% de núcleos picnóticos). Já os folículos atréticos apresentaram membrana da granulosa atenuada, rompimento das células da granulosa e aumento do número de células picnóticas ( 15% de núcleos picnóticos), segundo BLONDIN et al (1996). No presente estudo somente os folículos não atréticos foram considerados.

Os folículos foram classificados de acordo com as observações de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2011) em primordial, primário unilaminar, primário multilaminar ou pré-antral, secundário ou antral e pré-ovulatório ou de Graaf.

## **2.5. Análises Morfométricas**

Para estudo morfométrico, os cortes histológicos foram observados e fotomicrografadas em microscopia de luz (Microscópio Olympus BX61) e analisados por meio de programa de imagens IMAGE J 1.45. Para cada classe folicular foram analisados dez folículos ou o que havia para cada classe nos dois cortes histológicos utilizados. Os resultados do diâmetro folicular e oocitário foram expressos a partir da média entre a medida do maior diâmetro (diâmetro máximo) e a do diâmetro perpendicular a esta medida (diâmetro mínimo) (Figura 3).



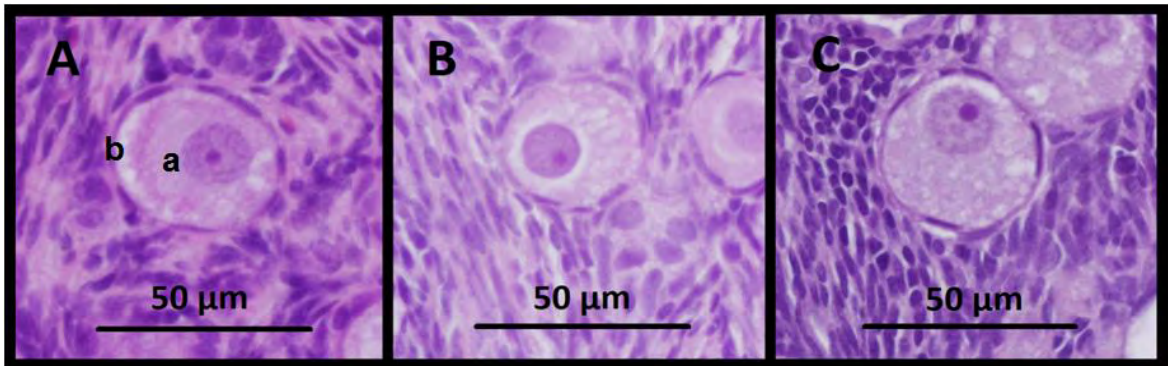
**Figura 3.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x do diâmetro máximo e mínimo de folículo primário multilaminar de gata doméstica. (A) Diâmetro folicular e (B) Diâmetro oocitário.

### III. ANÁLISE ESTATÍSTICA

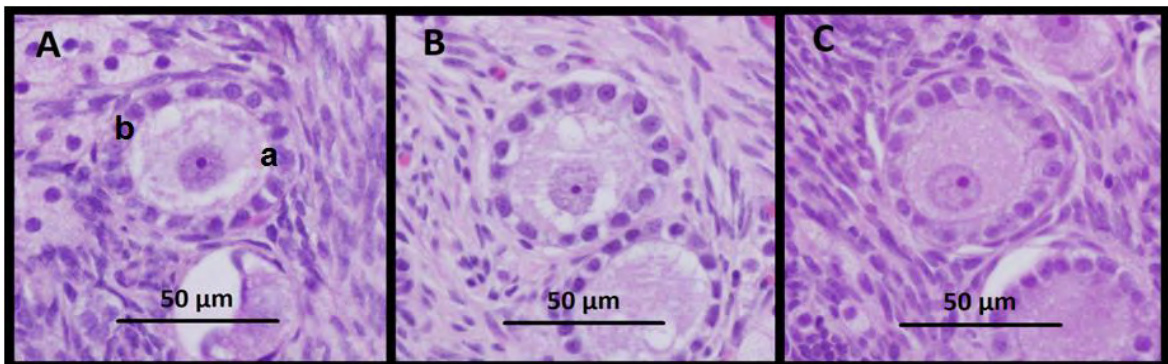
Os dados foram submetidos à análise de variância para comparar os grupos, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias pré-requisitos necessários para a análise de variância. A análise estatística das variáveis que não apresentaram distribuição normal foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. O coeficiente de correlação ( $r$ ), de determinação ( $r^2$ ) e a equação da regressão foram calculados para as variáveis selecionadas (ZAR, 1999). As estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o programa "GraphPad InStat version 3.10".

### IV. RESULTADOS

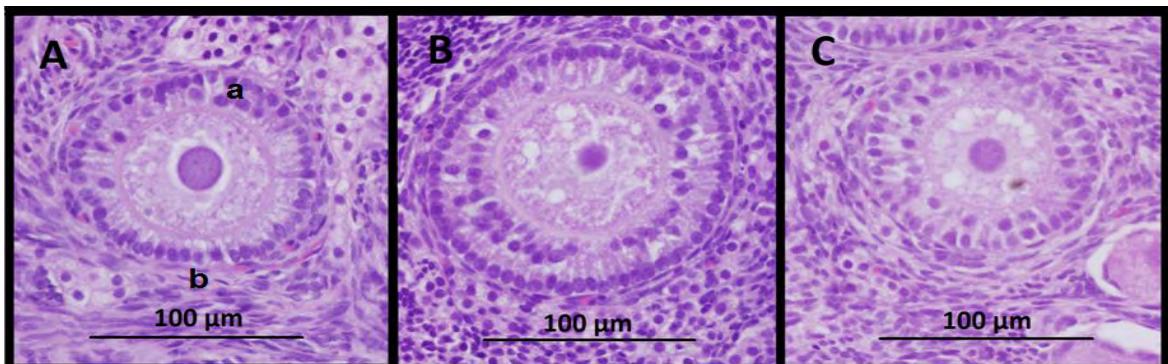
Ao todo 1039 folículos histologicamente preparados tiveram seu diâmetro máximo e mínimo, área e perímetro folicular e oocitário mensurados e classificados de acordo com Junqueira e Carneiro (2011): folículo primordial (Figura 4), primário unilaminar (Figura 5), primário multilaminar (Figura 6), secundário (Figura 7) e pré-ovulatório (Figura 8).



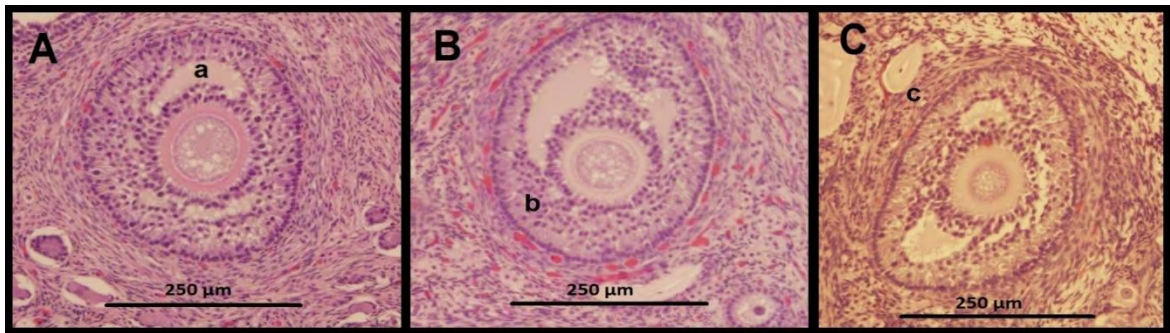
**Figura 4.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos primordiais. A: (a) oócito, (b) células da pré-granulosa.



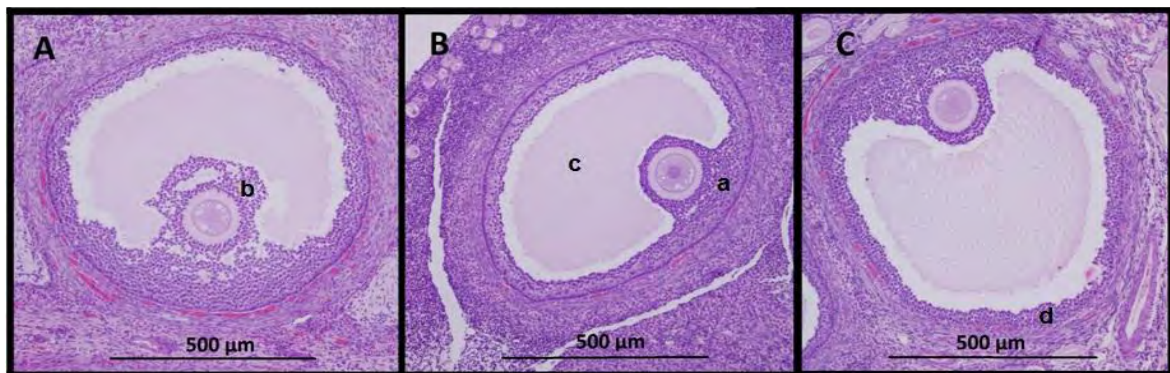
**Figura 5.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos primários unilaminares. A: (a) zona pelúcida em formação, (b) células da granulosa.



**Figura 6.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 400x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos primários multilaminares. A: (a) células da granulosa, (b) início da formação das tecas foliculares.



**Figura 7.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 200x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos secundários. A: (a) antro, B: (b) células da granulosa, C: (c) Teca externa.



**Figura 8.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 com aumento de 100x, de cortes longitudinais de ovários de 3 gatas domésticas de diferentes faixas etárias (A- jovem, B- adulta, C- idosa), corados com HE, onde se observam folículos pré-ovulatórios. A: (b) corona radiata, B: (a) cumulus oophorus, (c) cavidade antral e C: (d) células da granulosa.

#### 4.1. Diâmetro, Área e Perímetro

. A Tabela 2 contém os resultados obtidos na comparação dos diâmetros foliculares e oocitários de 17 gatas em diferentes faixas etárias. Os folículos primordiais do G1 diferiram significativamente do G2 quanto ao diâmetro folicular; assim como os primários unilaminares, os quais se mostraram significativamente diferentes do G3. Já em relação aos diâmetros oocitários, houve diminuição significativa nos folículos primordiais e primários unilaminares entre os grupos G1 e G2.

**Tabela 2.** Valores médios ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e mediana (Md) do diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) de folículos primordiais (P, n= 318), primários unilaminares (PU, n= 271), primários multilaminares (PM, n= 271), secundários (SE, n= 124) e pré-ovulatórios (PO, n= 55), de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 (4-12 meses), Grupo 2 (>1-6 anos) e Grupo 3 (> de 6 anos).

Estrutura	Classe	G1 (Jovens)		G2 (Adultas)		G3 (Idosas)	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md
Folículo	P	45,136 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	45,25	41,513 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>	41,4	43,247 $\pm$ 0,66 <sup>ab</sup>	43,55
	PU	70,350 $\pm$ 1,35	70,30 <sup>A</sup>	64,433 $\pm$ 1,53	63,35 <sup>B</sup>	68,119 $\pm$ 3,1	62,25 <sup>B</sup>
	PM	127,60 $\pm$ 4,3	114,95	132,53 $\pm$ 5,3	121,3	128,51 $\pm$ 6,6	119,43
	SE	452,66 $\pm$ 19,46	423,3	400,51 $\pm$ 18,28	371,6	388,11 $\pm$ 22,05	395,7
	PO	893,18 $\pm$ 43,49	885,45	887,99 $\pm$ 37,63	930,4	1014,0 $\pm$ 100,99	1036,1
Oócito	P	40,555 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	40,15	37,573 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	36,6	39,411 $\pm$ 0,57 <sup>ab</sup>	40,25
	PU	47,977 $\pm$ 0,89	47,1 <sup>A</sup>	43,009 $\pm$ 1,02	42,45 <sup>B</sup>	45,242 $\pm$ 1,51	43,45 <sup>AB</sup>
	PM	62,351 $\pm$ 1,56	59,8	65,778 $\pm$ 2,55	61,22	62,052 $\pm$ 2,36	58,72
	SE	112,80 $\pm$ 7,1	103	98,620 $\pm$ 10,72	91,55	88,70 $\pm$ 6,11	89,3
	PO	96,633 $\pm$ 3,56	94,35	101,35 $\pm$ 3,77	97,6	107,89 $\pm$ 12,95	116,7

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>A,B</sup> Medianas seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferente entre si pelo teste de Dunn (P<0,05)

A tabela 3 contém os resultados obtidos na comparação das áreas foliculares e oocitárias de 17 gatas em diferentes faixas etárias. Os folículos primordiais do G1 diferiram significativamente do G2 quanto à área folicular; assim como os primários unilaminares; os quais se mostraram significativamente diferentes do G3. Já em relação à área oocitária, encontramos diminuição



significativa entre os grupos G1 e G2 de folículos primordiais e folículos primários unilaminares, os quais se mostraram significativamente diferentes do grupo G3.

**Tabela 3.** Valores médios ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e mediana (Md) da área ( $\mu\text{m}^2$ ) de folículos primordiais (P, n= 318), primários unilaminares (PU, n=271), primários multilaminares (PM, n= 271), secundários (SE, n= 124) e pré-ovulatórios (PO, n= 55) de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 (4-12 meses), Grupo 2 (>de 1-6 anos) e Grupo 3 (> de 6 anos).

Estrutura	Classe	G1 (Jovens)		G2 (Adultas)		G3 (Idosas)	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md
Folículo	P	1941±51,85 <sup>a</sup>	1908,8	1652,4±46,89 <sup>b</sup>	1590,3	1776,9±48,44 <sup>ab</sup>	1723,3
	PU	4043,9±159,05	3810,3 <sup>A</sup>	3375,6±165,22	3137,9 <sup>B</sup>	4185,8±541,1	3086,7 <sup>B</sup>
	PM	14239±1061,6	9807	15522±1508,3	11130	15046±1606,4	10759
	SE	169435±14726	134712	137060±13732	107104	126038±13570	125592
	PO	672390±63002	634085	647261±54270	675397	921159±170350	956801
Oócito	P	1320,4±35,92 <sup>a</sup>	1305,1	1134,3±36,25 <sup>b</sup>	1036,7	1241,3±32,81 <sup>ab</sup>	1270,2
	PU	1851,9±67,46	1702,2 <sup>A</sup>	1497,0±71,02	1341,9 <sup>B</sup>	1721,0±138,22	1461,8 <sup>B</sup>
	PM	3225,1±162,81	2782,2	3823,3±351,1	2892,9	4061,6±848,16	2669,6
	SE	10157±1119,1	8336,8	6688,2±548,44	5903	6311,8±876,32	4949,4
	PO	7537,9±529,42	7046,5	8518,6±656,64	7721	10087±2399,5	10333

<sup>a, b</sup> Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>A, B</sup> Medianas seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferente entre si pelo teste de Dunn (P<0,05)

A Tabela 4 contém os resultados obtidos na comparação dos perímetros foliculares e oocitários de 17 gatas em diferentes faixas etárias. Os folículos primordiais do G1 diferiram significativamente do G2 quanto ao perímetro folicular;

assim como os primários unilaminares; os quais se mostraram significativamente diferentes do G3. Já em relação ao perímetro oocitário, encontramos diminuição significativa entre os grupos G1 e G2 de folículos primordiais e folículos primários unilaminares, os quais se mostraram significativamente diferentes do grupo G3.

**Tabela 4.** Valores médios ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e mediana (Md) do perímetro ( $\mu\text{m}$ ) de folículos primordiais (P, n= 318), primários unilaminares (PU, n= 271), primários multilaminares (PM, n= 271), secundários (SE, n=124) e pré-ovulatórios (PO, n= 55) de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 (4-12 meses), Grupo 2 (> de 1-6 anos) e Grupo 3 (> de 6 anos).

Estrutura	Classe	G1 (Jovens)		G2 (Adultas)		G3 (Idosas)	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md
Folículo	P	157,24 $\pm$ 2,13 <sup>a</sup>	158	145,56 $\pm$ 2,02 <sup>b</sup>	144,55	150,63 $\pm$ 2,02 <sup>ab</sup>	150,9
	PU	272,82 $\pm$ 34,55	222,4 <sup>A</sup>	204,29 $\pm$ 4,86	200,9 <sup>B</sup>	217,01 $\pm$ 9,71	201,05 <sup>B</sup>
	PM	407,25 $\pm$ 13,65	364	424,68 $\pm$ 17,21	390,3	395,65 $\pm$ 20,52	348,5
	SE	1487,5 $\pm$ 63,62	1405,7	1534,4 $\pm$ 2227,5	1210,1	1253,9 $\pm$ 72,45	1274,1
	PO	2958,2 $\pm$ 144	2995,9	2940,0 $\pm$ 128	3092,7	3430,8 $\pm$ 355,48	3749,4
Oócito	P	129,90 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	129,5	120,58 $\pm$ 1,88 <sup>b</sup>	116,45	126,37 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup>	128,5
	PU	152,99 $\pm$ 2,73	150,3 <sup>A</sup>	135,76 $\pm$ 3,3	132,75 <sup>B</sup>	143,18 $\pm$ 4,82	137,9 <sup>B</sup>
	PM	198,53 $\pm$ 5,07	194,1	208,80 $\pm$ 8,15	194,9	197,29 $\pm$ 7,34	187,35
	SE	342,28 $\pm$ 16,62	329,2	279,81 $\pm$ 12,65	277,5	282,70 $\pm$ 18,48	284,6
	PO	311,63 $\pm$ 11	302,65	327,35 $\pm$ 12,41	323,4	344,74 $\pm$ 43,82	363,9

<sup>a, b</sup> Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

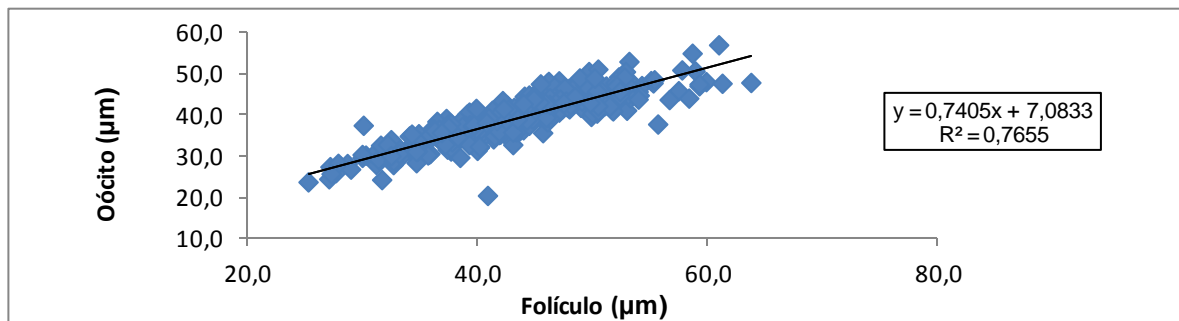
<sup>A, B</sup> Medianas seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferente entre si pelo teste de Dunn (P<0,05)

## 4.2. Relação de Crescimento do folículo e do oócito

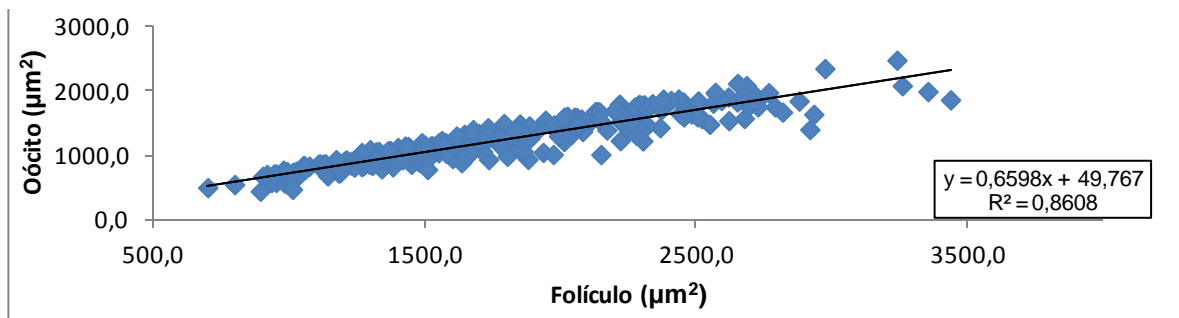
Verificando todos os folículos mensurados, foi determinada a relação entre o crescimento folicular e oocitário, utilizando o diâmetro, a área e o perímetro dos 1039 folículos.

Para cada estágio folicular foram estabelecidas 3 equações lineares que representam o padrão de crescimento entre o folículo e oócito. Uma equação demonstra esta relação utilizando o diâmetro folicular e oocitário; a outra mostra a relação através da área folicular e oocitária; e por fim, a equação que utiliza o perímetro folicular e oocitário. Assim temos as seguintes equações, onde  $x$ = mensuração folicular e  $y$ = mensuração oocitária. Nos folículos pré-ovulatórios não houve correlação positiva entre o crescimento do oócito em função do folículo.

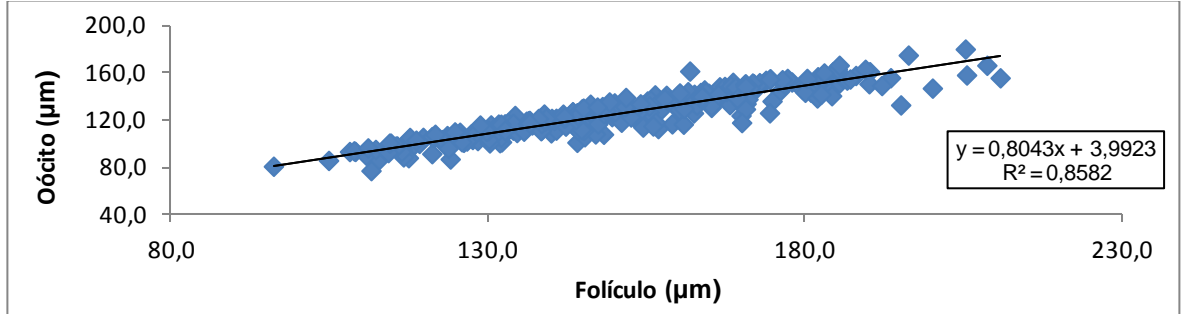
### 4.2.1. Folículo Primordial



**Figura 9.** Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 318 folículos primordiais, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

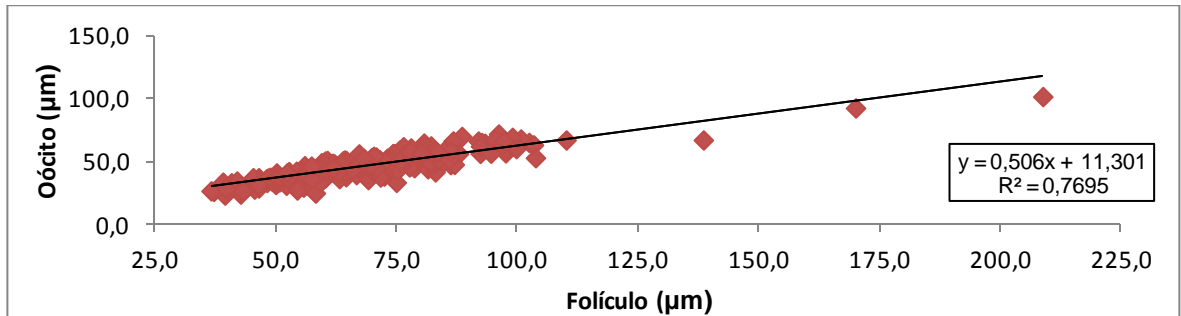


**Figura 10.** Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitária, em  $\mu\text{m}^2$ , de 318 folículos primordiais, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

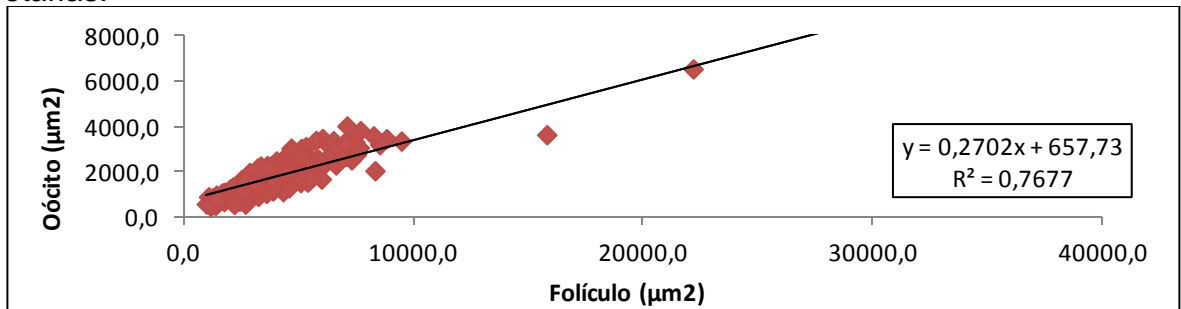


**Figura 11.** Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 318 folículos primordiais, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

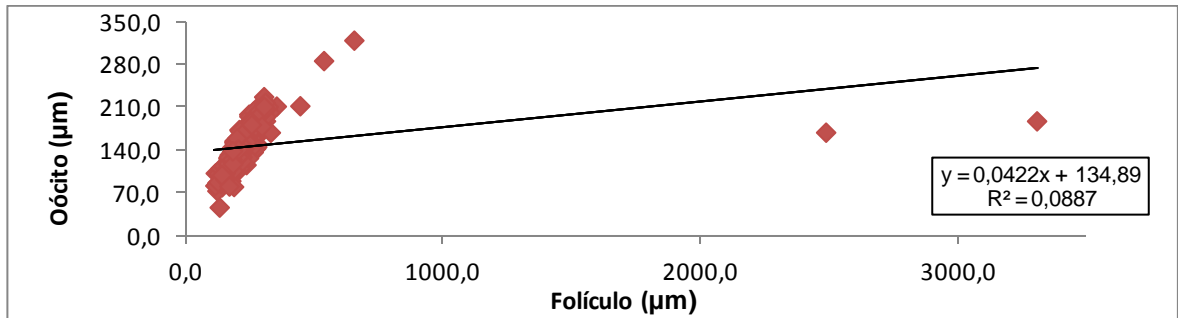
#### 4.2.2. Folículo Primário Unilaminar



**Figura 12.** Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários unilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

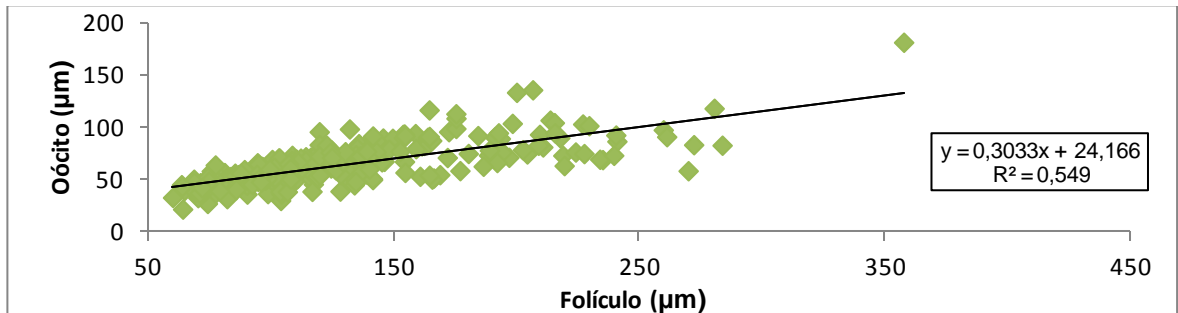


**Figura 13.** Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitária, em  $\mu\text{m}^2$ , de 271 folículos primários unilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

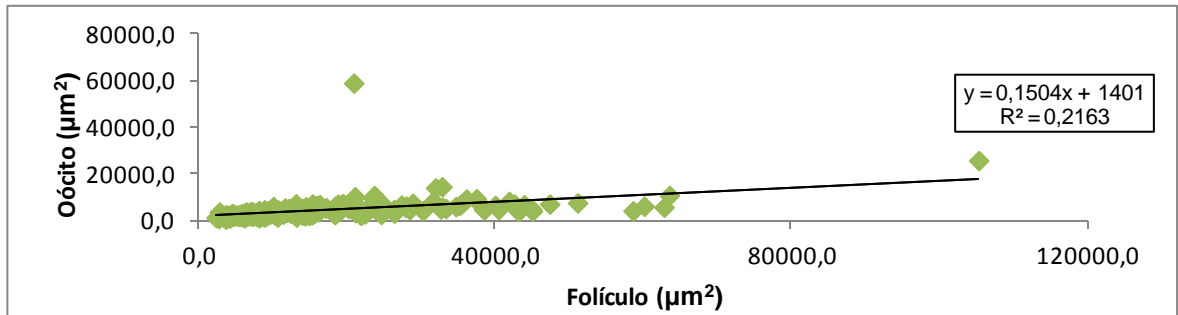


**Figura 14.** Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários unilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

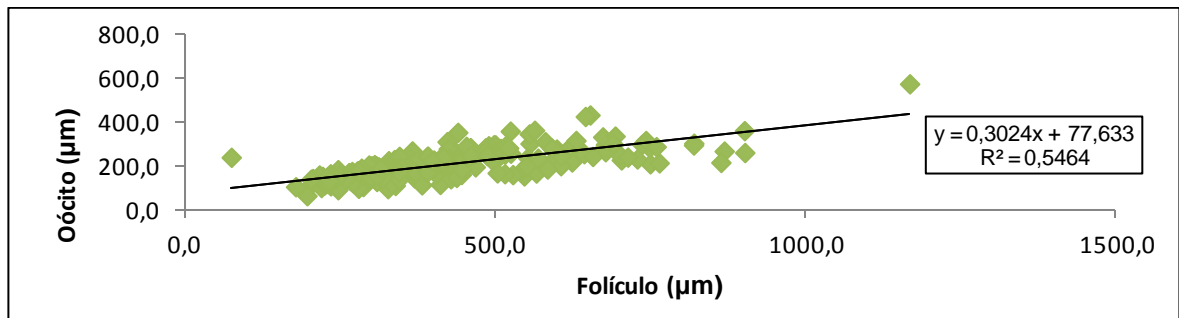
#### 4.2.3. Folículo Primário Multilaminar ou Pré- Antral



**Figura 15.** Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários multilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

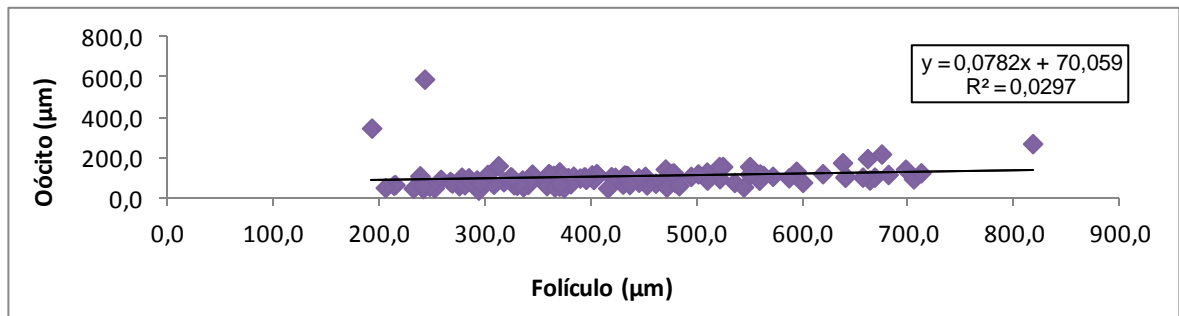


**Figura 16.** Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitária, em  $\mu\text{m}^2$ , de 271 folículos primários multilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

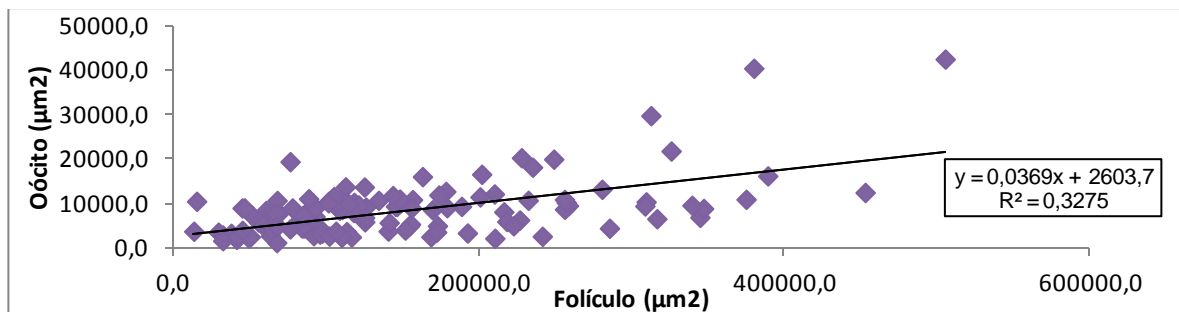


**Figura 17.** Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 271 folículos primários multilaminares, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

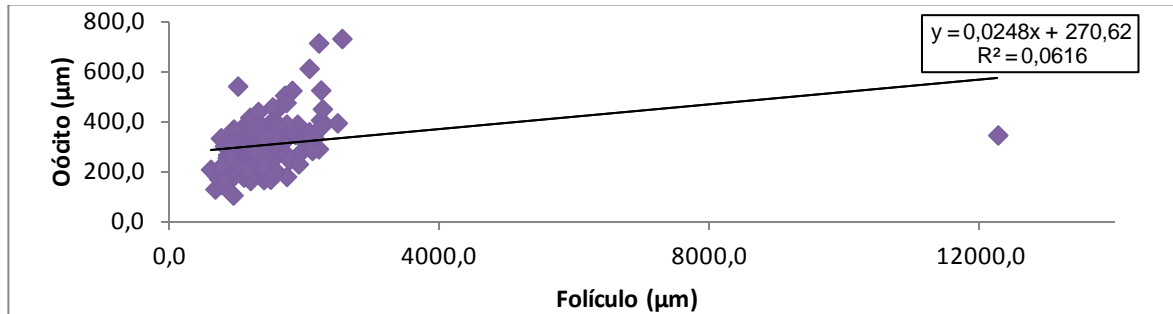
#### 4.2.4 Folículo Secundário ou Antral



**Figura 18.** Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 124 folículos secundários, de 17 gatas de diferentes faixas etárias



**Figura 19.** Representação gráfica da relação entre a área folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}^2$ , de 124 folículos secundários, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

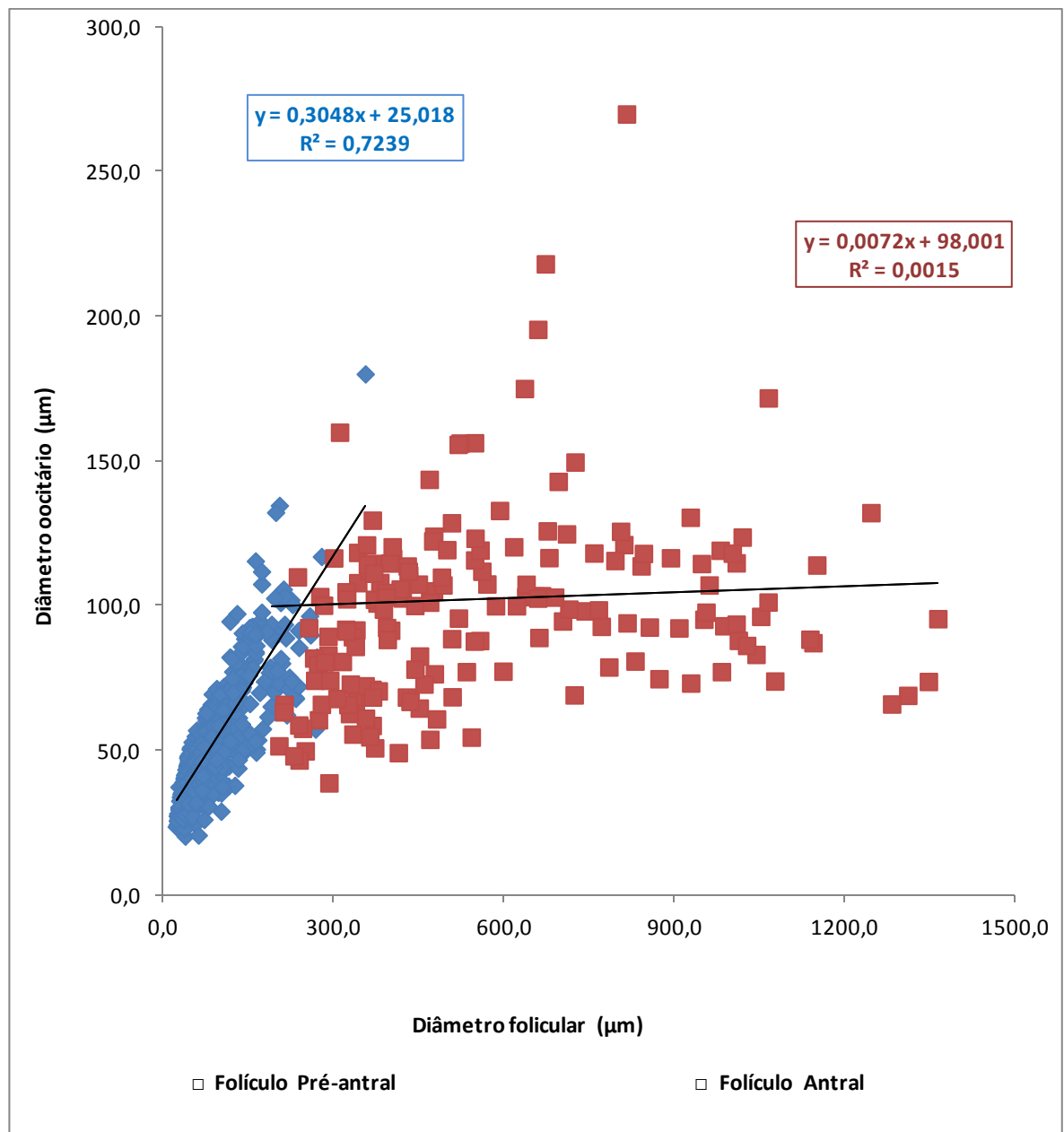


**Figura 20.** Representação gráfica da relação entre o perímetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 124 folículos secundários, de 17 gatas de diferentes faixas etárias.

A partir das análises das figuras anteriores é possível afirmar que antes da formação do antro ( $193,3 \mu\text{m}$  – valor do diâmetro do menor folículo antral), o crescimento do oócito acompanha o crescimento das células da granulosa do folículo. Para obter tal informação foram utilizados 860 folículos ovarianos pré-antrais (318 primordias, 271 primários unilaminares e 271 primários multilaminares) na confecção da Figura 21, onde se obteve a correlação do crescimento de folículos pré-antrais. A equação linear é  $y = 0,3048x + 25,018$  ( $r^2 = 0,7239$ ) ( $x =$  diâmetro folicular e  $y =$  diâmetro oocitário).

Com a formação do antro, o crescimento oocitário se torna mais lento que o crescimento do folículo. Fica evidente esta diminuição do crescimento por meio da redução da inclinação da reta a partir dos folículos secundários. Efetuando-se uma nova análise, esta com 179 folículos antrais (124 secundários e 55 pré-ovulatórios), a nova correlação, também apresentada da Figura 21, apresentou a equação linear  $y = 0,0072x + 98,001$  ( $r^2 = 0,0015$ ) ( $x =$  diâmetro folicular e  $y =$  diâmetro oocitário).

A intersecção das duas retas da Figura 21 correspondeu a folículo de  $245,4 \mu\text{m}$  de diâmetro folicular e  $99,8 \mu\text{m}$  de diâmetro oocitário. Tal folículo representa a interrupção do crescimento paralelo entre oócito e folículo.



**Figura 21.** Representação gráfica da relação entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 860 folículos pré-antrais (318 primordiais, 271 primários unilaminares e 271 primários multilaminares), e entre o diâmetro folicular e oocitário, em  $\mu\text{m}$ , de 179 folículos antrais (124 secundários e 55 pré-ovulatórios), de 17 gatas de diferentes faixas etárias.



## V. DISCUSSÃO

Neste estudo o diâmetro folicular médio foi superior em folículos primordiais, primários unilaminares e primários multilaminares (45,13  $\mu\text{m}$ , 70,35  $\mu\text{m}$  e 127,60  $\mu\text{m}$ ), quando comparado aos diâmetros encontrados em outras espécies como em porcas pré-púberes (33,8  $\mu\text{m}$ , 40,4  $\mu\text{m}$  e 84,5  $\mu\text{m}$ ) (Silva et al, 2011) e mulheres jovens (<13 anos) (39  $\mu\text{m}$  e 44,1  $\mu\text{m}$ ) (Westergaard et al, 2007). Ainda se tratando de espécies diferentes e com ovários maiores, percebe-se que os valores nas gatas jovens foram superiores.

Em gatas adultas, o diâmetro folicular médio foi inferior em folículos primordiais, primários unilaminares e primários multilaminares e superior nos folículos secundários ou antrais (41,51  $\mu\text{m}$ , 64,43  $\mu\text{m}$ , 132,53  $\mu\text{m}$  e 400,51  $\mu\text{m}$ , respectivamente) quando comparado aos resultados de Reynaud et al (2009) (44,3  $\mu\text{m}$ , 86,2  $\mu\text{m}$ , 155,6  $\mu\text{m}$  e 223,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Outros estudos em gatas observaram diminuição na média dos diâmetros de folículos primordiais, primários unilaminares e secundários (primários multilaminares), cujos valores foram 28,3  $\mu\text{m}$ , 41  $\mu\text{m}$  e 74,6  $\mu\text{m}$  (Carrijo Jr et al 2010) e 38,8  $\mu\text{m}$ , 63,9  $\mu\text{m}$  e 98,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Barber et al (2001). Diferenças também foram evidenciadas no diâmetro folicular médio de outras espécies como, por exemplo, em ovelhas adultas, onde os folículos primordiais apresentaram média de 39,4  $\mu\text{m}$  (Lundy et al, 1999). Já em cadelas os valores referentes aos primordiais, primários unilaminares, primários multilaminares (secundários) foram 44,3  $\mu\text{m}$ , 50,7  $\mu\text{m}$ , 148,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Barber et al, 2001).

O diâmetro folicular médio em gatas idosas foi superior em folículos primordiais, primários unilaminares (43,24  $\mu\text{m}$  e 68,11  $\mu\text{m}$ , respectivamente) quando comparado a outras espécies como mulheres acima de 36 anos, que obtiveram médias de 39,4  $\mu\text{m}$  e 53,5  $\mu\text{m}$  (Westergaard et al, 2007) e búfalas pós-púberes (7-10 anos) (35  $\mu\text{m}$  e 41,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (Mondadori et al, 2007).

O diâmetro oocitário médio de gatas jovens foi superior em folículos primordiais, primários unilaminares e primários multilaminares (40,55  $\mu\text{m}$ , 47,97  $\mu\text{m}$  e 62,35  $\mu\text{m}$ , respectivamente) quando comparado a outras espécies.

Pesquisas em leitoas pré-púberes apresentaram diâmetros oocitários médios de 26  $\mu\text{m}$ , 27,3  $\mu\text{m}$  e 39,1  $\mu\text{m}$  (Silva et al, 2011). Já em mulheres (<13 anos) os valores encontrados para folículos primordiais e primários unilaminares foram 34,3  $\mu\text{m}$  e 41  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Westergaard et al, 2007).

Em gatas adultas o diâmetro oocitário médio foi superior em folículos primordiais, primários unilaminares e primários multilaminares (43  $\mu\text{m}$ , 65,77  $\mu\text{m}$  e 98,62  $\mu\text{m}$ , respectivamente) quando comparados aos resultados em gatas de outros estudos como de Reynauld et al (2009) (40,5  $\mu\text{m}$ , 63,8  $\mu\text{m}$  e 97,3  $\mu\text{m}$ , respectivamente) e aos de Carrijo Jr et al (2010) que foram 23,1  $\mu\text{m}$ , 30,1  $\mu\text{m}$  e 40,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Estudos em ovelhas adultas evidenciaram valores semelhantes em folículos primordiais (34,1  $\mu\text{m}$ ) (Lundy et al, 1999).

A média do diâmetro oocitário em gatas idosas foi maior em folículos primordiais, primários unilaminares e primários multilaminares (39,41  $\mu\text{m}$ , 45,24  $\mu\text{m}$  e 62,05  $\mu\text{m}$ , respectivamente) quando comparado aos de búfalas pós-púberes (24,9  $\mu\text{m}$ , 26,9  $\mu\text{m}$  e 29,4  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (Mondadori et al, 2007). Já em mulheres acima de > 36 anos os diâmetros oocitários para folículos primordiais e primários unilaminares foram 35,1  $\mu\text{m}$  e 39,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Westergaard et al, 2007).

Hewitt e England (1998) avaliaram os efeitos da idade de cadelas e o tamanho de oócitos quando submetidos à maturação *in vitro* (MIV) e verificaram que estruturas com diâmetros inferiores a 100  $\mu\text{m}$  possuem material nuclear menor e, portanto, menor competência meiótica. Fêmeas com idade superior a sete anos obtiveram bons resultados, porém, as mais jovens tiveram maior sucesso na maturação. Já neste estudo os oócitos de gatas com as médias dos diâmetros acima de 100  $\mu\text{m}$  foram os provenientes de folículos secundários e gatas jovens apresentaram os maiores valores para diâmetro, área e perímetro, sugerindo que esta faixa etária seria ideal para a manipulação de oócitos e consequentemente maiores seriam as chances de sucesso na MIV.

Westergaard et al (2007) verificaram redução do diâmetro médio folicular em folículos primordiais e primários de mulheres acima de 36 anos (39.4  $\mu\text{m}$ )

quando comparados aos outros grupos mais jovens (20-27 anos - 41,9  $\mu\text{m}$ ), 27-36 anos - 41,5  $\mu\text{m}$ ). No presente estudo os parâmetros morfométricos avaliados em folículos primários unilaminares também foram inferiores em gatas idosas em relação às jovens (Diâmetro- G1: 70,30  $\mu\text{m}$  e G3: 62,25  $\mu\text{m}$ ) (Área - G1: 3810,3  $\mu\text{m}^2$  e G3: 3086,7  $\mu\text{m}^2$ ) (P- G1: 222,4  $\mu\text{m}$  e G3: 201,05  $\mu\text{m}$ ). Os dados revelaram efeitos relacionados com a idade e sugerem que folículos remanescentes e seus respectivos oócitos diminuem de tamanho com a idade.

.O início do acúmulo de líquido antral foi observado em folículos a partir de 193,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, valor superior (164  $\mu\text{m}$ ) ao encontrado por Reynaud et al (2009). Evidenciou-se padrão bifásico na dinâmica entre o crescimento folicular e oocitário, corroborando com os resultados de Reynaud et al (2009). Durante a primeira etapa de desenvolvimento (folículos primordiais, primários unilaminares e primários multilaminares), a taxa de crescimento entre folículo e oócito foi alta e mostra correlação linear, obtendo-se a equação linear  $y = 0,3048x + 25,018, r^2 = 0,7239$  ( $x =$  diâmetro folicular e  $y =$  diâmetro oocitário). Após a formação do antro e desenvolvimento de folículos secundários e pré-ovulatórios, o padrão de crescimento do oócito diminuiu em relação ao significativo crescimento folicular. Desta forma nova correlação linear:  $y = 0,0072x + 98,001, r^2 = 0,0015$  ( $x =$  diâmetro folicular e  $y =$  diâmetro oocitário) foi observada. Os resultados do crescimento dos oócitos em função dos folículos foram superiores aos descritos por Reynaud et al. (2009), que foram ( $y = 0,526x + 17,68, r^2 = 0,92$ ) para folículos pré-antrais, e ( $Y = 0,10x + 85,68, r^2 = 0,11$ ) para folículos antrais.

## VI. CONCLUSÃO

Os parâmetros morfométricos dos folículos e oócitos de gatas de diferentes idades foram avaliados, classificando-os nas respectivas categorias de acordo com as características observadas.

Gatas jovens obtiveram maiores valores para diâmetro, área e perímetro em folículos primários unilaminares em relação às idosas. Sugere-se que o “pool” de folículos pequenos remanescentes e seus respectivos oócitos presentes no ovário diminuem com a idade e que na fase senil esses folículos são de baixa qualidade, quando comparados ao início da vida reprodutiva.

Esse estudo possibilitou a observação do momento da formação do antro e evidenciou padrão bifásico do crescimento folicular em gatas domésticas, semelhante ao observado em outros animais domésticos, ou seja, antes da formação do antro o crescimento do oócito era paralelo ao do folículo, já após a formação do antro o crescimento do oócito era mínimo em relação ao grande desenvolvimento folicular.

A gata doméstica representa modelo ideal para estudar a foliculogênese devido à disponibilidade de folículos em todos os estágios, durante toda a vida reprodutiva. Estudos histomorfométricos do ovário poderão auxiliar em pesquisas de tecnologias reprodutivas assistidas, como por exemplo, a maturação *in vitro* (MIV), já que o tamanho e qualidade dos folículos e oócitos poderão afetar na MIV em felinos domésticos. Adicionalmente, estes estudos poderão auxiliar na preservação de felinos selvagens em extinção.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKS, D. H.; STABENFELDT, G.H. Prolactin in the cat II. Diurnal patterns and photoperiod effects. **Biology Reproduction**.v. 28. p. 933-939,1983.
- BANKS, D. R. Physiology and Endocrinology of the Feline Estrous Cycle. In:\_\_\_\_. **Current Therapy in Theriogenology**. 2 ed. Saunders, 1986, p. 795 e 796.
- BARBER, M. R.; LEE, S. M.; STEFFENS, W. L.; ARD, M.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Immunolocalization of zona pellucid antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. **Theriogenology**. v. 55. p. 1705-1717, 2001.
- BLONDIN, P.; DUFOUR, M.; SIDARD, M. A. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. **Biology of Reproduction**. n. 54. p. 631-7, 1996.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.
- CARRIJO JÚNIOR, O. A.; MARINHO, A. P. S.; CAMPOS, A. A.; AMORIM, C.A.; BÃO, S. N. Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. **Cells Tissues Organs**, Brasília, Brazil, v. 191, p. 152-160, 2010.
- CONCANNON, P. W.; HODGSON, B.; LEIN, D. Reflex LH release in estrous cat following single and multiple copulations. **Biology of Reproduction**. v. 23, p. 111-117, 1980.
- COAT- A- COUNT Progesterone, Siemens. Healthcare Diagnostic Inc. Los Angeles, CA 90045 USA. N° catálogo: (TKPG1)
- DIAGONE, K.V.; VICENTE, W.R.R.; PACHECO, M.R.; MATEUS, O. Oocyte Morphometry in Female Dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Anatomia Histologia Embryologia**, Jaboticabal, São Paulo, v. 37, p. 81-85, 2008.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Reprodução em felinos. In. ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna de pequenos animais: doença do cão e do gato**. 5. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2. p.1671-1672.

EVANS, A.A.O. Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. **Reproduction in Domestic Animals**, Dublin, Ireland, v. 38, p. 240-246, 2003.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Feline reproduction. In: \_\_\_\_\_. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3 ed. California: Saunders, 2004. p. 1016, 1017, 1019, 1022. FORTUNE, J.E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. **Biology of Reproduction**, New York, v. 50, p. 225-232, 1994.

GARTNER, L.P.; HEATT, J. L. Sistema Reprodutor Feminino. In: **Atlas de Histologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 256.

GRAPHPAD INSTAT VERSION 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA. Disponível em: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Acesso em: 01 mar. 2013.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 957-966, 1998.

HIRSFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**. v. 124. p. 43-101, 1991.

ISHIZAKI, M. N.; NASCIMENTP, A. A.; KANETO, C. N.; MONTANO, T. R. P.; PERRI, S. H. V.; VASCONCELOS, R. O.; BRESCIANI, K. D. S. Frequência e Intensidade parasitária de Helminthos gastrintestinais em felinos da zona urbana do município de Araçatuba-Sp. **ARS Veterinária**. , v. 22, p. 212-216, 2006.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. The Feline Estrous Cycle. In:\_\_\_\_. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: Elsevier, 2001, p. 396-397.

- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: \_\_\_\_\_. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 432- 439.
- LOFSTEDT, R. M. The estrous cycle of the domestic cat.** Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. **v. 4, p. 52-58, 1982.**
- LUNDY, T.; SMITH. P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N. L.; MC NATTY, K. P. Populations of granulose cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 115.p. 251-262, 1999.
- MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 32.n. 1. P. 36-49, 2008.
- MILLS, J. N.; VALLI, V. E.; LUMSDEN, J. H. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. **Canadian Veterinary Journal**. v. 20, p. 95-101, 1979.
- MONDADORI, R. G.; LUQUE, M. C. A.; SANTIN, T. R.; BÃO, S. N. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. n. 97. p. 323-33, 2007.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. O Início do Desenvolvimento Humano: Primeira Semana. In: **Embriologia Clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 15-30.
- PETERS, H.; McNATTY, K. P. The ovary. Berkeley and Los Angeles, CA: University of California Press, 1980.
- PRIEDKALNS, J. Sistema reproductor femenino In: DELLMAN, H.D.; BROWN, E.M. **Histologia veterinária**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 267.
- REYNAUD, K.; GICQUEL, C.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; FICHEUX, C.; BESTANDJI, M.; CHASTANT- MAILLARD, S. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p. 174-179, 2009.

ROMAGNOLI, S. Clinical approach to infertility in the queen. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 5. p. 143-146, 2003.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Journal: Bibliotheca Anatomica**. v.24. p. 77-92,1983.

SAMUELSON, D. A. Sistema reprodutor feminino. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de Histologia Veterinária**. 1 ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2007. p. 429 e 430.

SCOTT, P. P.; LLOYD- JACOB, M. A. Reduction in the anoestrous period of laboratory cats by increased illumination. **Nature**, v. 184, p. 2022, 1959.

SHILLE, V. M.; STABENFELDT, G. H. Luteal function in the domestic cat during pseudopregnancy and after treatment with prostaglandin F2 alpha. **Biology of Reproduction**. v. 21, p. 1217-1223, 1979.

SILVA, R. C.; BÁO, S. N.; JIVAGO, J. L. P. R.; LUCCI, C. M. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: Lipid component evolution. **Theriogenology**. v. 76. p.1647-4657, 2011.

TONIOLLO, G. H.; CURY, S. R.; VICENTE, W. R. R.; CAMACHO, A. A.; GARCIA, J. M.; VANTINI, R. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 32, n. 2, p. 125-9, 1995.

TSUTSUI, T.; STABENFELDT, G.H. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. **Journal Reproduction Fertility. Supplement**. v. 47. p. 29-35, 1993.

UCHIKURA. K.; NAGANO, M.; HISHINUMA, M. The effect of ovarian status and follicular diameter on maturational ability of domestic cat oocytes. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2011.DOI:10.1292 /JVMS. 10-0381.



- 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.
- WESTERGAARD, C. G.; BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y. Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. **Human Reproduction**. p. 1-7, 2007.
- WILDT, D. E. Effect of transportation on sexual behavior of cats. **Laboratory Animal Science**, v. 30, p. 910-912, 1980.
- WILDT, D. E.; CHAN, S. Y. W.; SEAGER, S. W, J.; CHAKRABORTY, P. K. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. Relationships during the coitus- induced luteal phase and the estrous period without mating. **Biology of Reproduction**. v. 25, p. 15-28, 1981.
- WILDT, D. E.; SCHIEWE, M. C.; SCHMIDT, P. M.; GOODROWE, K. L.; HOWARD, J. G.; PHILLIPS, L. G. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. **Theriogenology**. v. 25, p. 33-51, 1986.
- WLODARCZYK, R.; BUKOWSKA, M.; JACKWSKA, M.; MUCHA, S.; JASKOWSKI, J. M. *In vitro* maturation and degeneration of domestic cat oocytes collected from ovaries temperatures. **Veterinarni Medicina**, Poznan, v.54, p. 491-497, 2009
- YOUNG, B.; HEATH, J. W. Sistema Reprodutor feminino. In: \_\_\_\_\_. **Histologia Funcional**. 4. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 341 e 344.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 930p.

**Apêndice 1** Protocolo anestésico utilizado para cirurgia de OSH (Ovariosalpingo-histerectomia) em gatas domésticas.

<b>MPA</b> (Anestesia Pré-operatória) (IM- Intramuscular)	Acepromazina (0,05 mg/kg) Morfina (0,3 mg/ kg) Midazolam (0,2 mg/kg)
<b>Indução</b> (IV- Intravenoso)	Ketamina (5 mg/kg) Xilazina (0,5 mg/kg)
<b>Anestesia Peridural</b> (0,3 mL/kg)	Lidocaína (2% com vasoconstritor) Bupivacaína (0,5% com vasoconstritor) Fentanil (2 mcg/kg)

**Apêndice 2** Titulação hormonal de progesterona (P4) de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 ( até 1 ano), Grupo 2 (>1 até 6 anos) e Grupo 3 (> 6 anos), Araçatuba, SP, 2013.

<b>Grupo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>ng/mL P<sub>4</sub></b>
1	0,8	0,845
1	1	0,103
1	1	0,002
1	0,6	0,343
1	0,4	0,373
1	1	0,236
2	2	0,143
2	1,4	0,148
2	3	0,207
2	5	0,174
2	2,6	0,126
2	3	0,080
3	11	0,369
3	6,6	0,359
3	6,6	0,126
3	9	0,047
3	8	0,145

