

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

INGRID CAROLINE DA SILVA

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA OVARIANA E RECUPERAÇÃO DE COMPLEXOS  
*CUMULUS OOPHORUS* DE CADELAS SUBMETIDAS A  
OVÁRIO-SALPINGO-HISTERECTOMIA

PONTA GROSSA  
2017

INGRID CAROLINE DA SILVA

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA OVARIANA E RECUPERAÇÃO DE COMPLEXOS  
*CUMULUS OOPHORUS* DE CADELAS SUBMETIDAS A  
OVÁRIO-SALPINGO-HISTERECTOMIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para aprovação na disciplina de Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Zootecnia.

Orientador (a): Profa. Dra. Luciana da Silva Leal

PONTA GROSSA  
2017

*À Deus, por Seu amor cobrir as minhas fraquezas, e Sua fidelidade ser maior que todos os obstáculos na minha vida.*

*Dedico aos meus pais, Edson e Teresinha, por serem exemplo de vida e dedicação, tudo que sou, ou pretendo ser devo a vocês.*

*Aos meus irmãos Karine e Guilherme, por serem meu conforto e inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelas inúmeras vezes em que pensei não ser capaz, se tornar meu único refúgio e força.

Agradeço a meus pais, Edson José e Teresinha Schmidt, pelo apoio e esforço para que eu chegasse até aqui. Tudo que consegui até agora, só foi possível graças a confiança de vocês em mim, e todo empenho em garantir que eu realize meus sonhos.

Agradeço aos meus irmãos, Karine Letícia e Guilherme Augusto, pelo apoio e horas de descontração, quando em meio as dificuldades do dia a dia me fizeram sorrir.

Ao meu namorado Edvin Domingos Michel, por estar sempre ao meu lado, e pelas vezes em que foi compreensível em aceitar não estar.

Agradeço à minhas avós, Anna Hass Schmidt (*in memorian*) e Terezinha Vieira Santos, por todo cuidado, e por depositarem toda sua confiança e amor em mim.

À minha orientadora Profa Dra Luciana da Silva Leal, pelo conhecimento transmitido, pelas horas de estudo e dedicação para que a realização deste trabalho fosse possível. Pelos ensinamentos não somente acadêmicos, quanto profissionais. Por ser uma profissional dedicada e responsável, da qual eu nunca tive dúvida em pedir orientação.

À Valquiria Nanuncio Chochel e Fernanda Antunes Martins, pela ajuda na execução deste trabalho, pelas horas de aprendizagem, companheirismo e conhecimento compartilhado.

Agradeço aos meus amigos, em especial os da jornada acadêmica, e aos que de alguma forma se tornaram essências não somente nas horas de estudo, quanto de apoio e conforto.

Às clínicas veterinárias Auqmia e Espaço Animal, por se disponibilizarem em doar o material para realização do trabalho.

Ao CNPq pelo recurso fornecido para execução deste projeto.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade de fazer parte da instituição e por tornar possível a realização de minha formação como Zootecnista.

Aos professores, os do início da vida acadêmica, por garantirem todo meu conhecimento. Especialmente aos professores do curso de Zootecnia por serem para mim exemplo de vida, não somente profissional como pessoal.

A vocês agradeço com todo amor e reconhecimento.

“ Concedei-me, Senhor a serenidade necessária  
Para aceitar as coisas que não posso modificar.  
Coragem para modificar aquelas que posso e  
Sabedoria para conhecer a diferença entre elas.  
Vivendo um dia de cada vez  
Desfrutando um momento de cada vez  
Aceitando que as dificuldades constituem o caminho à paz  
Aceitando, como Ele aceitou  
Este mundo tal como é, e não como eu queria que fosse  
Confiando que Ele Acertará tudo  
Contanto que eu me entregue à Sua vontade  
Para que eu seja razoavelmente feliz nesta vida  
E supremamente Feliz com Ele eternamente na próxima. ”

## RESUMO

O conhecimento das particularidades reprodutivas das fêmeas caninas permite um melhor acompanhamento do ciclo estral, assim como favorece a implantação de técnicas de reprodução assistida, além de contribuir com o conhecimento dos aspectos reprodutivos de canídeos selvagens ameaçados de extinção. Os objetivos da pesquisa foram a obtenção das medidas ovarianas de 21 cadelas em sua maioria SRD (sem raça definida), sujeitas a OSH (ovário-salpingo-histerectomia) e o estudo de fatores que interferem na recuperação de CCOs (complexos *Cumulus oophorus*), relacionados ao animal (peso e idade) e ao ovário (biometria ovariana). A morfometria ovariana foi determinada com paquímetro, e os CCOs foram recuperados por fatiamento ovariano, e classificados em graus (G) 1, 2, 3 e expandido. As médias das variáveis para cada ovário foram comparadas pelo teste de t de Student ( $P < 0,05$ ). Os resultados foram correlacionados entre si pelo teste de Correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ). Os ovários direito (OD) e esquerdo (OE) apresentaram resultados semelhantes de morfometria e obtenção de CCOs. A recuperação de CCOs G1 se mostrou superior às demais categorias em ambos ovários. O comprimento do ovário apresentou correlação positiva significativa com a recuperação de CCOs G1 ( $r = 0,51$ ) e CCOs G3 ( $r = 0,47$ ). As quantidades de diferentes categorias de CCOs foram associadas, pois CCOs G1 contribuíram com a recuperação de CCOs G2 ( $r = 0,58$ ), G3 ( $r = 0,73$ ) e expandido ( $r = 0,79$ ). Conclui-se que os OD e OE são simétricos. O PC (peso corporal) assim como a IDE (idade) não influenciam na recuperação de CCOs, estes são influenciados pela morfometria ovariana.

**Palavras-chave:** Biometria. Ciclo Estral. Folículos. Ovários. Ovócito.

## ABSTRACT

Knowledge of the reproductive peculiarities of canine females allows for better monitoring of their estrous cycle, the implementation of techniques of assisted reproduction, and the contribution to the knowledge of the reproductive aspects of endangered wild canids. The objectives of the research were to obtain the ovarian measurements of 21 canine females mostly no breed defined, submitted to OH (ovary-hysterectomy) and to study the factors that interfere in the recovery of COC's (Cumulus-oocyte complexes) related to animal weight, age, and ovarian biometrics. The ovarian morphometry was determined using a caliper, and the COC's were retrieved by ovarian slicing and classified as 1, 2, 3 and expanded grades (G). The means of the variables for each ovary were compared by Student's t-tests ( $P < 0.05$ ). The results were correlated to each other by the Pearson Correlation test ( $P < 0.05$ ). The right (RO) and left (LO) ovaries presented similar morphometry results and COC's. The recovery of G1 COC's was greater than the other categories in both ovaries. The ovarian length showed a significant positive correlation with the recovery of G1 COC's ( $r = 0.51$ ) and G3 COC's ( $r = 0.47$ ). It has been shown that the recovery of COC's is associated since G1 COC's contributes with the recovery of G2 COC's ( $r = 0.58$ ), G3 COC's ( $r = 0.73$ ), and expanded COC's ( $r = 0.79$ ). In conclusion the right and left ovaries are symmetrical and the PC (body weight) and the IDE (age) do not influence the recovery of COC's, these are influenced by ovarian morphometry.

**Keywords:** Biometry. Estral Cycle. Follicles. Ovaries. Oocyte.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) de peso, medidas ovarianas, número de corpos lúteos e recuperação de complexos *Cumulus oophorus* de graus 1, 2, 3, expandido e total, nos ovários direito e esquerdo, de cadelas submetidas a OSH ..... 16
- Tabela 2 – Número total e porcentagem dos CCOs recuperados segundo a classificação nos ovários caninos direito e esquerdo ..... 18
- Tabela 3 – Estudo das correlações entre a biometria ovariana (peso, comprimento, largura e altura) e a recuperação de complexos *Cumulus oophorus* (graus 1, 2, 3, expandido e total) em fêmeas caninas ..... 19



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Altura
CCOs	Complexo <i>Cumulus oophorus</i>
CCOs exp.	CCOs classificado como expandido
CCOs G1	CCOs classificados como Grau 1
CCOs G2	CCOs classificado como Grau 2
CCOs G3	CCOs classificado como Grau 3
CE	Ciclo Estral
CL	Corpo Lúteo
COMP	Comprimento
E <sub>2</sub>	Estrógeno
EPM	Erro padrão da Média
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
IA	Inseminação Artificial
IDE	Idade
LARG	Largura
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Nº CL	Número de corpos lúteos
OD	Ovário Direito
OE	Ovário Esquerdo
OSH	Ovário-salpingo-histerectomia
P <sub>4</sub>	Progesterona
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F2 alfa
PC	Peso Corporal
PO	Peso do ovário

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
2.1 ANIMAIS .....	13
2.2 COLHEITA DOS OVÁRIOS E MORFOMETRIA OVARIANA .....	14
2.3 MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE CCOs .....	14
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	15
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	15
3.1 ESTUDO DA MORFOMETRIA OVARIANA .....	15
3.2 RECUPERAÇÃO DE CCOs .....	17
3.3 ESTUDO DO EFEITO DO PESO E MEDIDAS OVARIANAS NA RECUPERAÇÃO DE CCOs .....	18
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	21
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	22

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a população de *pets* é de 132,4 milhões de animais, demonstrando o relevante potencial do setor na economia nacional. Desses, 52,2 milhões são cães, 22,1 milhões são gatos, 18 milhões peixes, 37,9 milhões aves, e 2,2 milhões são representados pelos demais animais de estimação. Em 2016, o mercado *pet* nacional chegou a representar 0,37% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, sobressaindo-se no que se refere aos produtos elétricos e eletrônicos, e de automação industrial (PET BRASIL, 2016).

No ano de 2016, o faturamento do setor foi de R\$ 18,9 bilhões, evidenciando um crescimento de 4,9% sobre o ano anterior, garantindo ao país, o terceiro lugar no mercado mundial, atrás apenas do Estados Unidos e Reino Unido. Até setembro de 2016, almejava-se um crescimento de 5,7%, porém com os efeitos da inflação e da crise econômica, ocorreu uma queda no setor estimada em mais de R\$ 150 milhões no faturamento (PET BRASIL, 2016).

A receita do mercado *pet*, é composta por 67,5% de produtos de *pet food*, 16,7% é composta por *pet serv*, 8,1% é constituída por produtos *pet care* como, produtos higiênicos, acessórios e de beleza animal, e por fim 7,8% do mercado se refere a produtos *pet vet*, tais como medicamentos veterinários (ABINPET, 2016).

Conforme pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 62% dos domicílios brasileiros tem algum animal de estimação, sendo o cão responsável por 44,3% deste percentual. Em média, nas casas dos brasileiros que possuem animais de companhia há 1,8 cachorros por domicílio (IBGE, 2015).

A relação entre os humanos e os animais vem se intensificando progressivamente. Contudo, a falta de conscientização das pessoas sobre guarda responsável, aliada muitas vezes à carência de programas governamentais e sociais destinados ao controle populacional de animais, ocasiona a reprodução desses de forma descontrolada e excessiva, gerando assim, animais não domiciliados ou errantes. Como consequência, há a possibilidade de transmissão de zoonoses, além de que em algumas situações, os animais são criados em condições precárias, com privação de alimento, abrigo e maus tratos, interferindo desta maneira diretamente no seu bem-estar (LIMA; PARDINI; LUNA, 2010).

A fim de controlar a população de animais, faz-se necessário o controle reprodutivo dos mesmos por meio da esterilização cirúrgica empregando-se a técnica de ovário-salpingo-histerectomia (OSH) nas fêmeas. Quando realizada em animais saudáveis não apresenta risco, além de ser considerada como uma técnica com baixa incidência de morbidade e mortalidade (MACKAY, 1993). Sobretudo o método de OSH ajuda na redução da susceptibilidade às

enfermidades, tais como neoplasias mamárias e demais doenças reprodutivas (CONCANNON; MEYERS-WALLEN, 1991).

Geralmente a castração cirúrgica é recomendada entre cinco a sete meses de idade (IDE). Nesta faixa etária os animais não adquiriram ainda comportamentos indesejáveis, tais como comportamento de ansiedade ou de fuga, além de que quando realizada a castração antes do primeiro cio, evita o aparecimento de tumores mamários malignos (FOSSUM, 2008).

O expressivo crescimento na procura por animais de estimação, e o claro fortalecimento da relação existente entre o homem e seu animal, contribuem para a criação lucrativa de animais de companhia. Desta forma, a pesquisa científica aprimorou as biotecnologias da reprodução, como técnicas de maturação *in vitro* (MIV), inseminação artificial (IA) e congelamento de sêmen (BINSFELD et al., 2014).

A fisiologia da reprodução dos canídeos apresenta algumas particularidades, como: a duração do período fértil, da ovulação, a maturação e a fecundação dos ovócitos (OLIVEIRA; MARQUES JÚNIOR; NEVES, 2003; LUZ; FREITAS; PEREIRA, 2005).

Nas fêmeas caninas o início da puberdade ocorre entre dois a três meses após o animal atingir o peso adulto, o que coincide com o período de vida entre seis a doze meses, variando conforme a raça. As cadelas são consideradas monoéstricas, pois apresentam um episódio de estro em sua estação reprodutiva (REECE, 2008).

Segundo Cruz (2011), durante o período do ciclo estral (CE) ocorrem alterações no endométrio uterino de ordens morfológicas e bioquímicas, que estão relacionadas a proliferação, apoptose e diferenciação celular.

As alterações citológicas vaginais das cadelas são mais nítidas se comparadas aos demais animais domésticos, e se referem a cada estágio do ciclo estral. Dentre as alterações observadas destacam-se: o espessamento do epitélio vaginal, como consequência há perda de leucócitos, queratinização das células epiteliais vaginais (REECE, 2008), e diapedese dos eritrócitos que extravasam dos capilares sanguíneos da região uterina e vaginal, causando como consequência sangramento vaginal.

O CE canino compreende quatro fases com eventos notáveis, denominadas: proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (ANDERSEN, 1970).

A fase de proestro pode ou não estar associada a descarga vaginal hemorrágica, o que é causada pela diapedese eritrocitária por meio do endométrio, e ruptura dos capilares subepiteliais. Neste período que dura em média nove dias, variando de três a 21 dias, devido ao aumento nos níveis de estrógeno (E<sub>2</sub>) a fêmea canina apresenta a vulva edemaciada e hipertrófica, a cérvix fica desenvolvida, o endométrio uterino torna-se espessado, e ocorre

aumento na atividade glandular e crescimento dos ductos e túbulos da glândula mamária (FELDMAN; NELSON, 1996). Diferentemente do que ocorre com outras espécies de mamíferos domésticos, nas cadelas assim como em canídeos selvagens, ocorre a luteinização pré-ovulatória dos folículos ovarianos, e com isso ocorre aumento na concentração plasmática de progesterona ( $P_4$ ) (CONCANNON; HANSEL; VISEK, 1975).

A ovulação ocorre aproximadamente dois dias após o pico de hormônio luteinizante (LH), logo no início do estro, os ovócitos são liberados mesmo estando ainda imaturos, pois encontram-se em profase I, embora nas outras espécies os ovócitos se encontram na fase de metáfase II no momento da ovulação. Portanto nas cadelas, os ovócitos vão ser maturados fora do ambiente folicular, na tuba uterina, onde haverá a fertilização e a evolução do óvulo até o estágio de blastocisto (LUVONI et al., 2005). A fase de estro é caracterizada pela receptividade da fêmea ao macho.

Após a ovulação ocorre a formação do corpo lúteo (CL), que é responsável pela secreção de  $P_4$  (HAFEZ; HAFEZ, 2004). No estágio de diestro, há secreção de valores máximos de  $P_4$ , que diminuem logo em seguida (CONCANNON, 1986). Nas fêmeas que foram fertilizadas, os CLs são mantidos por aproximadamente dois meses, período da gestação, e a diminuição dos níveis de  $P_4$  ocorre devido a influência da Prostaglandina F2 alfa ( $PGF_{2\alpha}$ ), responsável pela luteólise (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Todavia, nas fêmeas não gestantes, a diminuição na concentração de  $P_4$  se deve à apoptose das células luteínicas (OLIVEIRA; MARQUES JÚNIOR, 2006). Nas fêmeas gestantes o período de diestro é de 56 a 68 dias, enquanto que nas não prenhes varia de 60 a 100 dias (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989).

O período de anestro é compreendido pela transição dos ciclos estrais, apresentando como característica o baixo nível de  $P_4$ , podendo variar de um a seis meses (MIALOT, 1988).

Os ovários das fêmeas caninas são pequenos, de forma alongada, oval e achatada. Apresentam geralmente comprimento médio de 2 cm. Ambos ovários, direito e esquerdo, são envolvidos por uma bolsa peritoneal, denominada de bolsa ovariana, que apresenta uma abertura semelhante a uma fenda. As camadas que dão origem a esta bolsa são de músculo liso e gordura, de maneira que continuam até o corno uterino, dando forma ao mesossalpinge e o ligamento próprio do útero (ELLENPORT, 1986).

No córtex ovariano estão contidos os folículos em vários estágios de desenvolvimento, CLs, células intersticiais e demais elementos no parênquima ovariano (PRIEDKALNS, 1982; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O folículo ovariano é a unidade funcional da gônada das fêmeas (ARIYARATNA; GUNAWARDANA, 1997). É uma estrutura altamente organizada, e constituída essencialmente pelo ovócito envolvido por células foliculares, limitando-se por uma membrana basal que o separa do estroma ovariano (LANDIM-ALVARENGA, 2006). Conforme o folículo ovariano cresce, o antro (espaço intrafolicular) é tomado por líquido. Neste momento, as células foliculares se dividem em dois subtipos: células do complexo *Cumulus oophorus* (CCOs) que são íntima e metabolicamente ligadas ao ovócito, e células murais que formam a parede do folículo (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

As células do CCOs contêm projeções celulares que atravessam a zona pelúcida, formando pequenas junções com o citoplasma do ovócito, do tipo *gap junctions*, junções essas que permitem a transferência direta de moléculas de baixo peso molecular para o ovócito, tais como: metabólitos da glicose, nucleotídeos, íons e aminoácidos fundamentais para o seu crescimento e desenvolvimento adequado (EPPIG, 1991; GANDOLFI et al., 2005).

O entendimento das particularidades reprodutivas das cadelas possibilita um melhor acompanhamento do seu ciclo estral, além de auxiliar a implantação de técnicas de reprodução assistida (PAULA, 2008).

Técnicas de reprodução assistida permitem o aproveitamento de ovócitos de fêmeas caninas que apresentam alta genética e de fêmeas que possuem alguma doença reprodutiva (HISHINUMA et al., 2004). Sobretudo, deve-se considerar que a cadela é utilizada como modelo de estudo para a reprodução e conservação de material genético de canídeos selvagens ameaçados de extinção.

Frente ao exposto, objetivou-se a obtenção da biometria ovariana e o estudo de fatores que interferem na recuperação de CCOs em cadelas submetidas à OSH, na cidade de Ponta Grossa, PR.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa/PR, Brasil, registrado no Protocolo nº 5906/2016 desta Comissão.

### **2.1. ANIMAIS**

A população em estudo, pertencente a cidade de Ponta Grossa/PR, era heterogênea e o Peso Corporal (PC) e a IDE média foram conhecidos apenas no momento da aquisição do

genital feminino nas clínicas veterinárias. O escore de condição corporal dos animais e fase do CE em que se encontravam não foram determinados nesta pesquisa.

## 2.2. COLHEITA DOS OVÁRIOS E MORFOMETRIA OVARIANA

Os ovários de 21 fêmeas predominantemente sem raça definida (SRD) (exceto duas, uma Blue Heeler e outra Basset), submetidas à OSH foram fornecidos pelas clínicas veterinárias Auqmia e Espaço Animal, ambas localizadas em Ponta Grossa/PR, no período compreendido entre 09/02/2017 à 28/09/2017. Foram anotados o PC e IDE das fêmeas, assim como o nome de cada animal possuidor da genitália.

Os ovários foram conservados em sacos plásticos, com a identificação do animal (nome, PC e IDE), lavados e preservados em solução fisiológica (0,9% de Cloreto de Sódio) aquecida a 36°C dentro de uma caixa de isopor isotérmica até a chegada ao laboratório de Anatomia e Reprodução Animal, no Bloco de Zootecnia da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, respeitando-se o menor intervalo de tempo possível entre a castração cirúrgica e a chegada ao laboratório.

No laboratório, os ovários foram dissecados com uso de tesoura e pinça anatômica autoclavadas para a posterior realização das seguintes avaliações: peso (g), comprimento (cm), largura (cm) e altura (cm) do ovário. O peso do ovário foi determinado em balança digital (Marte®) e as medidas dos ovários foram feitas com um paquímetro.

## 2.3. MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE CCOs

Posteriormente à realização das avaliações morfométricas, os ovários foram então colocados sobre placas de Petri com solução fisiológica aquecida à aproximadamente 36°C, fatiados (*slicing*) e escarificados com o auxílio de lâmina de bisturi e pinça anatômica. Para a recuperação e avaliação dos CCOs, o lavado foi examinado em estereomicroscópio (*Optech optical technology germany*®).

Os CCOs foram classificados em graus 1, 2, 3 e expandido, conforme o aspecto do citoplasma do ovócito e o número de camadas de células do *cumulus* segundo a metodologia descrita por Hewitt e England (1997), sendo:

- Grau 1: pigmentação escura do citoplasma do ovócito, com uma ou mais camadas de células do *cumulus*;
- Grau 2: pigmentação clara do citoplasma do ovócito, com camadas incompletas de células do *cumulus*;

- Grau 3: pigmentação pálida do citoplasma do ovócito, sem formato definido e sem células do *cumulus* aderidas;
- Expandido: células do *cumulus* expandidas.

## 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *software* estatístico utilizado para a estudo dos resultados obtidos foi o Minitab® 18. Os dados de biometria ovariana e recuperação de CCOs foram analisados por meio de estatística descritiva (média, erro-padrão e porcentagem). Os valores médios de biometria ovariana e quantidade e qualidade dos CCOs obtidos em cada ovário foram comparados pelo Teste t de Student. Os dados de PC, IDE, peso e medidas ovarianas, número de CLs, assim como número e grau dos CCOs foram correlacionados entre si pelo teste de Correlação de Pearson, sendo considerada uma correlação muito fraca  $r \leq 0,25$ , fraca  $r > 0,25$  e  $\leq 0,50$ , moderada  $r > 0,50$  e  $\leq 0,75$  e forte quando  $r > 0,75$ . Em todas as análises, os efeitos foram declarados significativos ao nível de 5% de significância.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de ovários utilizada no experimento foi de 42, obtidos em sua maioria de animais SRD, que resultaram em uma média de PC de  $15,00 \pm 1,20$  kg, e IDE média de  $2,72 \pm 0,32$  anos.

### 3.1. ESTUDO DA MORFOMETRIA OVARIANA

Os ovários direito (OD) e esquerdo (OE) apresentaram resultados similares em todas as variáveis estudadas ( $P > 0,05$ ), demonstrando desta forma simetria entre os lados direito e esquerdo.

Na tabela 1 estão descritas as médias de peso, da morfometria ovariana, do número de CLs e da recuperação de CCOs, em ambos ovários, das 21 cadelas submetidas a OSH.

O peso médio do OD encontrado no estudo foi de  $0,70 \pm 0,08$  g, enquanto que do OE foi de  $0,69 \pm 0,08$  g, ambos não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Os pesos encontrados estão próximos aos descritos por Binsfeld et al. (2014), que avaliando a morfometria ovariana de cadelas com média de  $9,38 \pm 0,99$  kg de PC em diferentes fases do CE, encontraram média de peso ovariano de  $0,58 \pm 0,08$  g. No estudo, os autores verificaram que o peso ovariano não sofre influência das fases do ciclo que o animal se encontra, bem como as medidas ovarianas, visto que não houve correlação significativa entre a morfometria ovariana e as fases do CE.



Frandsen; Wilke e Fails (2011) indicaram que o peso do ovário canino pode variar de 3 a 12 g. No entanto, os autores não relacionaram esses valores com a raça, a IDE e a fase do CE das fêmeas.

As medidas de comprimento e largura dos OD e OE encontradas corroboram com os valores descritos por Frandsen; Wilke e Fails (2011), que apontaram uma faixa de comprimento dos ovários caninos de no máximo 2,5 cm e de 1,5 cm de largura.

Das 21 cadelas avaliadas, 13 apresentaram CLs nos ovários, resultando em uma média de  $2,57 \pm 0,51$  para o OD, e  $1,71 \pm 0,51$  para o OE. Assim sendo, pode-se sugerir que a 61,90% das fêmeas encontrava-se na fase de diestro do CE, fase em que há o estabelecimento dos CLs que serão responsáveis pela manutenção da gestação por meio da secreção de P<sub>4</sub> por aproximadamente dois meses, período este compreendido pela gestação das cadelas que foram fertilizadas (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989).

**Tabela 1** – Valores médios e erro padrão da média (EPM) de peso, medidas ovarianas, número de corpos lúteos e recuperação de complexos *Cumulus oophorus* de graus 1, 2, 3, expandido e total, nos ovários direito e esquerdo, de cadelas submetidas a OSH

Variáveis	OD	OE	P
	Média ± EPM		
PO (g)	0,70 ± 0,08	0,69 ± 0,08	0,96
COMP (cm)	1,54 ± 0,06	1,60 ± 0,08	0,53
LARG (cm)	0,97 ± 0,05	0,94 ± 0,05	0,66
ALT (cm)	0,72 ± 0,07	0,66 ± 0,03	0,44
Nº CLs	2,57 ± 0,51	1,71 ± 0,51	0,24
CCOs 1	24,10 ± 5,73	22,57 ± 4,21	0,83
CCOs 2	5,00 ± 1,14	4,29 ± 0,68	0,59
CCOs 3	3,95 ± 0,94	4,71 ± 1,09	0,60
CCOs exp.	0,91 ± 0,33	1,10 ± 0,31	0,68
Total CCOs	33,95 ± 7,06	32,67 ± 5,77	0,89

Significativo \*P < 0,05.

PO – peso do ovário; COMP – comprimento; LARG – largura; ALT – altura; Nº CLs – número de corpos lúteos; CCOs 1 – complexos *Cumulus oophorus* grau 1; CCOs 2 – complexos *Cumulus oophorus* grau 2; CCOs 3 – complexos *Cumulus oophorus* grau 3; CCOs exp. – complexos *Cumulus oophorus* expandidos.

**Fonte:** A autora.

Segundo Christiansen (1984) apud Benetti; Toniollo e Oliveira (2004), a fase de diestro tem início após a última receptividade da fêmea ao macho, e persiste até o endométrio se regenerar completamente, o que dura geralmente de 80 a 155 dias. Nesta fase do CE, as

fêmeas encontram-se mais susceptíveis a desenvolver piometra, devido às desordens hormonais, e à alta concentração de P<sub>4</sub>, que podem ocasionar infecção bacteriana e anomalias no endométrio (GANDOTRA et al., 1994).

Ainda que os animais estudados fossem jovens, quatro deles (19,04%) apresentaram hiperplasia cística endometrial, sendo este, um fator de predisposição à piometra.

A administração de altos níveis de P<sub>4</sub> como contraceptivo em fêmeas caninas saudáveis, durante período prolongado, pode ocasionar lesões no útero que são compatíveis com a piometra (GOBELLO et al., 2003), assim como aumentar a susceptibilidade uterina por microrganismos patogênicos.

Quanto a recuperação total de CCOs e as médias dos diferentes graus estudados, não houve diferença significativa entre OD e OE. Sendo a média do total de CCOs de  $33,95 \pm 7,06$  no OD e  $32,67 \pm 5,77$  no OE. A similaridade dos resultados é decorrente da simetria ovariana o que possibilitou que ambos os ovários possuíssem a mesma área tecidual para crescimento folicular.

### 3.2. RECUPERAÇÃO DE CCOs

A identificação da qualidade dos ovócitos considera a aparência do citoplasma, que deve apresentar-se escuro e homogêneo e as camadas das células do CCOs, que preferivelmente devem ser múltiplas (HEWITT; ENGLAND, 1997).

Assim como o tamanho dos ovócitos, a morfologia nuclear e as células do CCOs são parâmetros para seleção destes para técnicas de MIV (LUVONI et al., 2005). Pesquisas revelam que apenas ovócitos com duas ou mais camadas de células do CCOs são capacitados a continuar seu desenvolvimento quando cultivados *in vitro*, enquanto que ovócitos de camada única tendem a se degenerar a partir de 48 horas após cultivo (NICKSON et al., 1993).

Conforme mostra a Tabela 2, foram recuperados no total 713 CCOs no ovário direito (OD), enquanto que no ovário esquerdo (OE) foram recuperados 686 CCOs no total.

No OD foram recuperados 506 (70,97%) CCOs de grau 1 (CCOs G1), 105 (14,73%) CCOs de grau 2 (CCOs G2), 83 (11,64%) CCOs de grau 3 (CCOs G3), e 19 (2,66%) células do *cumulus* expandidas (CCOs exp.). Já no OE, obtiveram-se 474 (69,10%) CCOs G1, 90 (13,12%) CCOs G2, 99 (14,43%) CCOs G3, e 23 (3,35%) de CCOs exp.

Bisfeld et al. (2014) obtiveram ao todo 1.642 CCOs de 55 cadelas avaliadas, resultando em uma média de 29,85 por animal, média esta inferior à da presente pesquisa, que foi de 66,62 CCOs/animal. A média encontrada pode ser devida ao padrão genético heterogêneo das fêmeas que contribuiu para recuperação de CCOs de qualidade e em diferentes idades.

A recuperação de CCOs 1 se mostrou superior as demais categorias em ambos ovários. Apparício-Ferreira (2010), analisando a recuperação de CCOs por método de fatiamento (*slicing*) de 49 cadelas de diversas raças, com idades de 1 a 7 anos, em fases folicular, lútea e anestro reprodutivo, também recuperou maiores quantidades de CCOs de grau 1 (CCOs G1), obtendo em média 47,57 CCOs por fêmea.

**Tabela 2** – Número total e porcentagem dos CCOs recuperados segundo a classificação nos ovários caninos direito e esquerdo

Variáveis	OD		OE	
	Nº	%	Nº	%
CCOs 1	506	70,97	474	69,10
CCOs 2	105	14,73	90	13,12
CCOs 3	83	11,64	99	14,43
CCOs exp.	19	2,66	23	3,35
CCOs Total	713	100,00	686	100,00

Significativo \*P < 0,05.

CCOs 1 – complexos *Cumulus oophorus* grau 1; CCOs 2 – complexos *Cumulus oophorus* grau 2; CCOs 3 – complexos *Cumulus oophorus* grau 3; CCOs exp. – complexos *Cumulus oophorus* expandido.

**Fonte:** A autora.

Bisfeld et al. (2014) recuperaram 955 (58,16%) CCOs G1, 430 (26,19%) CCOs G2, 62 (3,78%) CCOs G3 e 195 (11,88%) CCOs exp.

Embora a obtenção de ovócitos por meio da aspiração folicular representar uma técnica mais simples, não é muito usada em canídeos devido à dificuldade de se observar os folículos do tecido ovariano (LUVONI et al. 2005); desta forma a recuperação de CCOs fica limitada, sendo o método de fatiamento ovariano ao longo da extensão dos ovários sugerido por Nickson et al. (1993) e Hewitt e England (1997), como o método mais eficaz, por garantir uma maior recuperação dos CCOs.

A técnica por fatiamento ovariano, adotado no presente trabalho, possibilitou uma maior exposição do córtex ovariano, permitindo desta maneira que os CCOs pudessem ser recuperados com maior facilidade e em número razoável. Além de ser um método rápido e prático.

### 3.3. ESTUDO DO EFEITO DO PESO E MEDIDAS OVARIANAS NA RECUPERAÇÃO DE CCOs

Na tabela 3 estão representadas as correlações simples entre as características das fêmeas caninas, tais como PC (kg) e IDE (anos), biometria ovariana e a recuperação de CCOs dos 42 ovários das 21 cadelas submetidas a OSH.

**Tabela 3** – Estudo das correlações entre a biometria ovariana (peso, comprimento, largura e altura) e a recuperação de complexos *Cumulus oophorus* (graus 1, 2, 3, expandido e total) em fêmeas caninas

Variáveis	PC (kg)	IDE (anos)	PO (g)	COMP (cm)	LARG (cm)	ALT (cm)	Nº CLs	CCOs 1	CCOs 2	CCOs 3	CCOs exp.	CCOs Total
PC (kg)	1,00	0,45*	0,44*	0,55*	0,38	0,30	-0,23	0,30	0,02	0,23	0,12	0,12
IDE (anos)		1,00	0,38	0,47*	0,35	0,46*	0,25	-0,01	-0,22	-0,01	-0,24	-0,05
PO (g)			1,00	0,83*	0,93*	0,69*	0,34	0,30	0,21	0,28	-0,06	0,25
COMP (cm)				1,00	0,81*	0,50*	0,21	0,51*	0,42	0,47*	0,26	0,40
LARG (cm)					1,00	0,64*	0,24	0,35	0,37	0,48*	0,05	0,28
ALT (cm)						1,00	0,17	-0,08	-0,02	-0,06	-0,21	0,07
Nº CLs							1,00	-0,27	-0,16	-0,25	-0,43*	-0,13
CCOs 1								1,00	0,58*	0,73*	0,79*	0,64*
CCOs 2									1,00	0,71*	0,73*	0,73*
CCOs 3										1,00	0,66*	0,53*
CCOs exp.											1,00	0,69*
CCOs Total												1,00

Significativo \*P < 0,05.

PC – peso corporal; IDE– idade; PO – Peso do ovário; COMP – comprimento; LARG – largura; ALT – altura; Nº CL – número de corpos lúteos; CCOs 1 – complexos *Cumulus oophorus* grau 1; CCOs 2 – complexos *Cumulus oophorus* grau 2; CCOs 3 – complexos *Cumulus oophorus* grau 3; CCOs exp.- complexos *Cumulus oophorus* expandido.

Fonte: A autora.

O PC das fêmeas, assim como a IDE não apresentaram correlação significativa com a quantidade e a qualidade de CCOs recuperados.

Em estudo realizado por Tucholski et al. (2008), também não se detectou diferença na recuperação de CCOs de fêmeas em diferentes idades.

A idade mais aconselhável para obtenção de ovócitos para técnicas como MIV é em torno de um a seis anos, contudo fêmeas de raça pura podem dispor de um número menor de ovócitos viáveis se comparadas às fêmeas resultantes de diferentes raças, ou seja, mestiças ou até mesmo SRD (SONGSASEN; WILDT, 2007). Portanto, a ausência de padrão racial no experimento pode ter contribuído com a recuperação semelhante de CCOs em diferentes idades.

É necessário considerar que, nas condições do presente estudo, a maioria das fêmeas apresentava IDE fértil e atividade reprodutiva (idade mínima de 5 meses e máxima de 7 anos) e, que por se tratarem principalmente de cadelas SRD, o PC sofreu grande variação (peso mínimo de 3,20 kg e máximo de 25 kg), isso pode explicar a ausência do efeito do PC e da IDE na recuperação de CCOs.

As medidas de comprimento ( $r = 0,83$ ), largura ( $r = 0,93$ ) e altura ( $r = 0,69$ ) determinaram o peso ovariano, pois quanto maior o ovário maior tende a ser seu peso. Esses achados validam com os descritos por Binsfeld et al. (2014) que também verificaram correlações entre o peso ovariano e as demais dimensões ovarianas (comprimento:  $r = 0,86$ ; largura:  $r = 0,94$  e altura:  $r = 0,92$ ;  $P < 0,001$ ).

Observa-se que o comprimento do ovário apresentou correlação positiva com a recuperação de CCOs G1 ( $r = 0,51$ ) e CCOs G3 ( $r = 0,47$ ). Assim como, a recuperação de CCOs G3 foi influenciada pela largura ( $r = 0,48$ ).

Resultados como estes são compreendidos, pois ovários maiores apresentam maior extensão de tecido ovariano.

O CL é composto por fibroblastos, células musculares lisas, células do sistema imune, endoteliais e pela hiperplasia e/ou hipertrofia das células foliculares e da teca interna (SALLES; ARAÚJO, 2010).

A existência de CL nos ovários limitou a recuperação de CCOs exp., pois estas variáveis apresentaram correlação negativa fraca ( $r = -0,43$ ). Binsfeld et al. (2014), também não encontraram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) tanto em número quanto em qualidade de CCOs recuperados nas diferentes fases do CE.

Revelou-se que a recuperação de CCOs estão interligas, pois CCOs G1 contribuíram com a recuperação de CCOs G2 ( $r = 0,58$ ), G3 ( $r = 0,73$ ) e exp. ( $r = 0,79$ ) e consequentemente com a recuperação total de CCOs ( $r = 0,64$ ).

#### **4. CONCLUSÕES**

A morfometria ovariana mostra-se semelhante às medidas normais de ovários de fêmeas caninas encontradas na literatura. Os ovários direito e esquerdo apresentam morfometrias semelhantes, portando são simétricos. A recuperação de CCOs não é afetada pelo PC e IDE do animal, e sim pelas medidas ovarianas (comprimento e largura), contudo deve-se considerar que a população de fêmeas em estudo apresenta composição genética distinta, uma vez que se trata de animais SRD.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, A. C; GOOD LS (Ed). **The Beagle as an experimental dog**. Ames, IA: Iowa State University Press, 1970. p. 321-326.
- APPARÍCIO-FERREIRA, M. **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônio e espermatozóides**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2010.
- ARIYARATNA, H. B. S; GUNAWARDANA, V. K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. **Small Ruminant Research**, v. 26, p. 123-129, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO (ABINPET): **Dados de Mercado**. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/2015>>. Acesso em 25 de set. de 2017.
- BENETTI, A. H; TONIOLLO, G. H; OLIVEIRA, J. A. Concentrações séricas de progesterona, 17  $\beta$ -estradiol e cortisol durante o final do proestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 471-478, 2004.
- BINSFELD, L. C; DARRIBA, R. V; BORGES, J. L; OTUTUMI, L. K; SANTOS, I. W. DOS; LEAL, L. S. Avaliação ovariana morfométrica e recuperação de complexos *cumulus oophorus* de cadelas em diferentes fases do ciclo estral. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, n. 2, p. 31-39, 2014.
- CONCANNON, P. W; HANSEL, W; VISEK, W. J. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 13, p. 112-121, 1975.
- CONCANNON, P.W. **Physiology and endocrinology of canine pregnancy**. In: MORROW, D. A (Ed.). *Current therapy in theriogenology*. 2. ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1986. p. 491-497.
- CONCANNON, P. W; MCCANN, J. P; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 3-25, 1989.
- CONCANNON, P. W; MEYERS-WALLEN, V. N. Currents and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, p. 1214-1224, 1991.
- CRUZ, S. A. F. **Proliferação e apoptose celular no endométrio da cadela**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 71p. 2011.
- DURRANT, B. S; PRATT, N. C; RUSS, K. D; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, p. 917-932, 1998.

ELLENPORT. Órgãos Genitais Femininos. In: GETTY. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bio Essays**, n. 11, p. 569-574, 1991.

FELDMAN, E. C; NELSON, R. W. **Ovarian cycle and vaginal cytology: canine and feline endocrinology and reproduction**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 529-546.

FELDMAN E. C; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003.

FRANDSON, R. D; WILKE. L. W; FAILS. A. D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 337-342.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital: Cirurgia de pequenos Animais**. 3. ed. Mosby: Elsevier, 2008.

GANDOLFI, F; BREVINI, T. A. L; CILLO, F; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Scientific and Technical Review**, v. 24, p. 413-423, 2005.

GANDOTRA, V. K; SINGLA V. K; KOCHHAR, H. P. S; CHAUHAN, F. S; DWIVEDI, D. Haematological and bacteriological studies in canine pyometra. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, n. 71, p. 816-818, 1994.

GILCHRIST, R. B; RITTER, L. J; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 431-446, 2004.

GOBELLO, C; CASTEX, G; KLIMA, L; RODRIGUEZ, R; CORRADA, Y. A. Study of two protocol combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. **Theriogenology**, New York. v. 60, p. 901-908, 2003.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, 2004.

HEWITT, D. A; ENGLAND, G. C. W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 83-91, 1997.

HISHINUMA, M. et al. Recovery, morphological quality, and in vitro maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 62, p. 1652-1662, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE): **Proporção de domicílios com cachorros e gatos - Brasil e Grandes Regiões**. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/0000002194060612201506180294064.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/0000002194060612201506180294064.pdf)>. Acesso em 10 de out. de 2017.



JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica:** Aparelho reprodutor feminino. 10. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 432-444.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Fecundação e clivagem. In: PRESTES, N. C; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 1-21.

LIMA, A. F. M; PARDINI, L; LUNA, S. P. L. Avaliação de sobrevivência, alterações genito-urinárias, comportamentais e de peso corpóreo no pós-operatório tardio em cadelas e gatas submetidas à ovariário-salpingo-histerectomia sob diferentes métodos de ligadura do pedículo ovariano. **ARS veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 2, p. 60-65, 2010.

LUVONI, G. C; CHIGIONI, S; ALLIEVI, E; MACIS, D. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 41-59, 2005.

LUZ, M. R; FREITAS, P. M. C; PEREIRA, E. Z. Gestação e parto de cadelas: fisiologia, diagnóstico de gestação e tratamento das distocias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 3/4, p. 142-150, 2005.

MACKAY, C. A. Veterinary practitioners role in pet overpopulation. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, p. 918-921, 1993.

MIALOT, J. P. **Noções básicas de fisiologia sexual:** patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. Porto Alegre: Metrópole, 1988. p. 17-27.

NICKSON, D. A; BOYD, J. S; ECKERSHALL, P. D; FERGUSON, J. M; HARVEY, M. J. A; RENTON J. P. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, n.47, p. 231-240, 1993.

OLIVEIRA, E. C. S; MARQUES JÚNIOR, A. P; NEVES, M. M. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela - revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003.

OLIVEIRA, E. C. S; MARQUES JÚNIOR, A. P. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 1/2, p.11-18, 2006.

PAULA, M. C. **Indução do estro em cadelas.** 2008. Monografia - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

PET BRASIL: **Mercado Brasileiro.** Disponível em: <<http://www.petbrasil.org.br/mercado-brasileiro>>. Acesso em 25 de set. de 2017.

PRIEDKALNS, J. Sistema reprodutor feminino. In: DELLMAN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária.** Zaragoza: Acribia, 1982. p. 343-369.

REECE, W. O. **Anatomia e Fisiologia dos Animais Domésticos.** 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 400-401.

SALLES, M. G. F; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: Revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 3, p. 185-194, 2010.

SONGSASEN, N; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 2-22, 2007.

TUCHOLSKI, A. P; RASCHELLI, D. L; MORAIS, R. N. et al. Quantidade de oócitos obtidos em fêmeas caninas em diferentes faixas etárias em diestro e anestro. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 3, p.341-347, 2008.

