

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Avaliação histológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino e uso de metodologias ativas no ensino superior

Morgana Alves Borges

Pelotas, 2023

Morgana Alves Borges

Avaliação histológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino e uso de metodologias ativas no ensino superior

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Prof.^a. Dr^a. Bruna da Rosa Curcio

Coorientador(es): Prof. Dr. Eduardo Leite Gastal

Prof. Dr. Francisco Leo Nascimento de Aguiar

Prof. Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

B732a Borges, Morgana Alves

Avaliação histológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino e uso de metodologias ativas no ensino superior [recurso eletrônico] / Morgana Alves Borges ; Bruna da Rosa Curcio, orientadora ; Eduardo Leite Gastal, Francisco Leo Nascimento de Aguiar, Gustavo Desire Antunes Gastal, coorientadores. — Pelotas, 2023.
100 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Ovário equino. 2. Manipulação de tecido. 3. Histologia. 4. Estratégias de ensino. I. Curcio, Bruna da Rosa, orient. II. Gastal, Eduardo Leite, coorient. III. Aguiar, Francisco Leo Nascimento de, coorient. IV. Gastal, Gustavo Desire Antunes, coorient. V. Título.

CDD 636.108981

Morgana Alves Borges

Avaliação histológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino e
uso de metodologias ativas no ensino superior

Data da Defesa: 29/11/23

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Bruna da Rosa Curcio (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Fernanda Almeida
Doutora em Ciência Animal pela Universidade de Alberta

Prof. Dr. Paulo Henrique Almeida Campos
Doutor em Biologia Celular pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Rodrigo Desessards Jardim
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico esta Tese a minha avó Geni (*in memoriam*), meus pais, marido e filha,
com todo meu amor e gratidão.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

À minha filha Isabella, pois é nela que encontro forças para continuar dia após dia, a mãe te ama incondicionalmente!

Aos meus pais, Helena e Mogar, por todo amor que me é dedicado e acima de tudo, por todo apoio e confiança na realização dos meus sonhos. Aos meus avós, foi uma honra vivenciar o amor que a mim foi concedido.

Ao meu amor, Wesley, pela paciência, carinho e amizade. Sou imensamente grata a Deus por ter você ao meu lado!

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Bruna da Rosa Curcio, pelo valioso conhecimento compartilhado com paciência e carinho, pela oportunidade de desenvolver meu estudo na área que sempre me cativou, concluo o meu Doutorado admirando cada vez mais a sua força, dedicação e paixão pelo seu trabalho! Obrigada pela confiança, serei eternamente grata por toda amizade e amparo durante esses anos!

Aos meus orientadores, por me concederem sua orientação com amor durante todo o Doutorado, juntamente com a oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente através do conhecimento transmitido ao longo deste período, Prof. Dr. Carlos Eduardo W. Nogueira, Prof. Dr. Eduardo Leite Gastal, Prof. Dr. Gustavo D. A. Gastal, Prof. Dr. Francisco L. N. Aguiar, Prof. Dr. Antônio Sérgio V. Jr., Prof.^a Dr.^a Carine D. Corcini, obrigada pela confiança depositada em mim e por todo o apoio!

A todos os colegas de pós-graduação, graduação do grupo ClinEq e aos colaboradores do HCV. Agradeço a convivência, amizade e o aprendizado que obtive junto ao grupo.

As amigas que fiz durante esses anos, Mariana Mousquer, Rafaela Souza, Gabriela Castro, Marcos Neto, Rafaela Amestoy, Milena Antunes, Esther Mello, Taís Del Pino, Giovana Mancilla, Isadora Paz, Manoela Pacheco, Jayne Pedroso e especialmente a Luiza Gheno por estar sempre ao meu lado e me apoiar nos

momentos mais difíceis, você se tornou parte da minha família! A todos vocês, minha gratidão!

À Universidade Federal de Pelotas pela infraestrutura, e a todos que contribuem de alguma forma para a formação de Mestres/Doutores do Curso de Pós-graduação em Veterinária (PPGV). O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq).

"É justo que muito custe o que muito vale!"
Sta. Teresa D'Ávila

Resumo

BORGES, Morgana Alves. **Avaliação histológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino e uso de metodologias ativas no ensino superior**. 2023. 100f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A espécie equina tem sido um modelo experimental atraente para a investigação comparativa da foliculogênese em seres humanos e animais domésticos, devido a uma série de semelhanças na dinâmica folicular. Neste sentido, a obtenção de tecido ovariano equino de alta qualidade é crucial para garantir a eficácia das técnicas de manipulação ovariana. Portanto, é essencial realizar uma análise histológica que preserve a integridade morfológica do tecido, estabelecendo um protocolo de fixação adequado para assegurar a preservação dos folículos pré-antrais da forma mais fidedigna ao tecido ovariano fresco original, mitigando danos. Desta forma, a presente tese objetivou aprimorar os protocolos de fixação para preservar a morfologia dos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino. Adicionalmente, foram formuladas metodologias ativas no desenvolvimento de habilidades de pesquisa junto a estudantes de graduação em medicina veterinária. No primeiro estudo, ovários ($n = 6$) de éguas jovens submetidas a ovariectomia foram fragmentados ($3 \times 3 \times 1$ mm; 20 fragmentos/ovário). Os fragmentos de tecido ovariano equino foram destinados a fixação com etanol 70% por curto período (ST-EtOH, 45 minutos) em comparação a dois fixadores clássicos [solução de Carnoy (CAR) e paraformaldeído a 4% (PFA)] em diferentes tempos de fixação (6 horas, 12 horas). Após processamento histológico clássico, as lâminas obtidas foram avaliadas quanto a morfologia (normal ou anormais), e estágio de desenvolvimento folicular, as densidades de células foliculares e estromais, além dos diâmetros nucleares dos folículos e oócitos inclusos em tecido ovariano equino. Como resultado, demonstrou-se que a solução de Carnoy melhor preservou a morfologia celular de tecido ovariano equino. Observamos que o paraformaldeído a 4% é um fixador adequado para avaliação morfológica de folículos pré-antrais, além de possuir a vantagem de ser compatível com técnicas de imunohistoquímica quando comparado com os demais fixadores. Além disso, o fixador ST-EtOH se mostrou uma boa alternativa quando é necessária uma avaliação histológica rápida. Adicionalmente, no segundo estudo foi possível avaliar o envolvimento dos estudantes de graduação em veterinária na pesquisa, utilizando metodologias ativas de ensino, visando capacitar os estudantes a adquirir habilidades essenciais para sua formação, construir conhecimentos científicos e estimular o pensamento crítico. A experiência da utilização das metodologias ativas contribuiu para a elaboração de um segundo estudo com foco nos procedimentos de manipulação de tecido ovariano equino, e fornecendo aos estudantes uma visão mais abrangente das aplicações práticas e científicas nesta área.

Palavras-chave: ovário equino; manipulação de tecido; histologia; estratégias de ensino

Abstract

BORGES, Morgana Alves. **Histological evaluation of pre-antral follicles in equine ovarian tissue and the use of active teaching methodologies in higher education**. 2023. 100f. Thesis (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

The equine species has been an attractive experimental model for comparative research on folliculogenesis in humans and domestic animals due to several similarities in follicular dynamics. In this regard, obtaining high-quality equine ovarian tissue is crucial to ensure the effectiveness of ovarian manipulation techniques. Therefore, it is essential to perform a histological analysis that preserves the morphological integrity of the tissue by establishing an appropriate fixation protocol to ensure the preservation of pre-antral follicles as faithfully as possible to the original fresh ovarian tissue, mitigating damage. Thus, this thesis aimed to improve fixation protocols to preserve the morphology of pre-antral follicles within equine ovarian tissue. Additionally, active teaching methodologies were developed to foster research skills among undergraduate veterinary students. In the first study, ovaries ($n = 6$) from young mares subjected to ovariectomy were fragmented ($3 \times 3 \times 1$ mm; 20 fragments/ovary). Equine ovarian tissue fragments were subjected to fixation with 70% ethanol for a short period (ST-EtOH, 45 minutes) in comparison to two classic fixatives [Carnoy's solution (CAR) and 4% paraformaldehyde (PFA)] at different fixation times (6 hours, 12 hours). After standard histological processing, the obtained slides were assessed for morphology (normal or abnormal), follicular developmental stage, densities of follicular and stromal cells, as well as nuclear diameters of follicles and oocytes within equine ovarian tissue. As a result, it was demonstrated that Carnoy's solution better preserved the cellular morphology of equine ovarian tissue. It was observed that 4% paraformaldehyde is a suitable fixative for morphological evaluation of pre-antral follicles, and it has the advantage of being compatible with immunohistochemical technique, compared to the other fixatives. Additionally, the ST-EtOH fixative proved to be a good alternative when a quick histological evaluation is required. Furthermore, in the second study, it was possible to assess the involvement of undergraduate veterinary students in research, utilizing active teaching methodologies aimed at equipping students with essential skills for their education, build scientific knowledge, and stimulating critical thinking. The experience of using active teaching methodologies contributed to the development of a second study focused on equine ovarian tissue manipulation procedures and provided students with a broader perspective on the practical and scientific applications in this field.

Keywords: equine ovary; tissue manipulation; histology; teaching strategies

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 The heterogeneity pattern of the total number of equine preantral follicles counted per treatment within each replicate (A) and per replicate within each treatment (B) are indicated by dots using different colors, as shown in the legends..... 64
- Figura 2 Mean ($\pm$ SEM) number of morphologically (A) normal and (B) abnormal equine preantral follicles [primordial, developing (transitional, primary, and secondary), and overall (primordial and developing follicles combined)] within the different fixative treatments (ST-EtOH = short-time ethanol; CAR = Carnoy's solution; PFA = paraformaldehyde) and periods of fixation (6 h, 12 h) 65
- Figura 3 (A) Mean ($\pm$ SEM) percentage of morphologically normal equine preantral follicles [primordial, developing (transitional, primary, and secondary), and overall (primordial and developing follicles combined)] exposed to the different fixatives (ST-EtOH = short-time ethanol, CAR = Carnoy's solution, PFA = paraformaldehyde), and periods of fixation (6 h, 12 h). (B) Illustrative images of equine preantral follicles enclosed in ovarian fragments fixed with Carnoy's solution. (i–iv) Normal and (v–viii) abnormal follicles. (i, v) Primordial, (iambi) transitional, (iii, vii) primary, and (iv, viii) secondary follicles..... 66

Figura 4	Boxplot charts comparing (A, B) oocyte nuclear and (C, D) follicular diameters (μm) of (A, C) primordial and (B, D) developing preantral follicles using different fixative solutions (ST-EtOH, short-time ethanol; CAR, Carnoy's solution; PFA, paraformaldehyde), and periods of fixation (6 h and 12 h)	67
Figura 5	Boxplot charts comparing the oocyte nucleus-follicle diameter ratio of (A) primordial and (B) developing preantral follicles.....	68
Figura 6	(A) Mean ($\pm$ SEM) of follicular density [normal and abnormal follicles combined per area (cm^2)] in fragments of equine ovarian tissue exposed to different fixatives (ST-EtOH, short-time ethanol; CAR, Carnoy's solution, PFA, paraformaldehyde), regardless of fixation time. (B) Illustrative images of preantral follicular density are shown; (i, iv) ST-EtOH, (ii, v) CAR, and (iii, vi) PFA. (C) Mean ($\pm$ SEM) stromal cell density per area in ovarian tissue fragments exposed to different fixatives regardless of fixation time. (D) Scatterplot correlation between stromal cell density with nucleus-follicle diameter ratio among fixative solutions considering primordial and developing follicles ($r = 0.34$; $P < 0.001$). (E) Mean ($\pm$ SEM) of stromal cell density per area ($2500 \mu\text{m}^2$) in fragments of ovarian tissue exposed to different fixatives and fixation times (6 h, 12 h). (F) Illustrative images of (vii) low stromal cell density in the ST-EtOH treatment and (viii) high stromal cell density in the CAR treatment.....	69

Artigo 2

Figura 1	Atividade prática de fragmentação de tecido.....	77
Figura 2	Encontros teóricos das oficinas de fragmentação de tecido ovariano equino.....	79

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Different types of fixatives, periods of fixation, and tissue size used for histological processing of equine ovarian tissue.....	60
Tabela 2	Preantral follicle density within ovarian fragments from six mares submitted to different fixative solutions and times of exposure.....	61
Tabela 3	Supplementary Table 1. Density of preantral follicles (per cm ²) classified as morphologically normal or abnormal, and follicular class (primordial or developing) enclosed in equine ovarian fragments submitted to different fixative solutions.....	63

Artigo 2

Tabela 1	Questionário de avaliação aplicado aos discentes do curso de Medicina Veterinária participantes das oficinas de manipulação de tecido ovariano equino.....	81
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABCCC	Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo
AEEC	Animal Experimentation Ethics Committee
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAR	Carnoy
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Exp.	Experiment
FAPERGS	Fundação Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
h	Hora
HCV	Hospital de Clínicas Veterinária
IHC	Immunohistochemistry
L x W x H	Length x Width x Height
min	Minutos
MNF	Morphologically Normal Follicle
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PFA	Paraformaldeído
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Room Temperature
SEM	Standard Error of the Mean
ST-EtOH	Short Time Ethanol
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
W.O.	Whole Ovary
LH	Hormônio Luteinizante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante

GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotropina
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
IGFs	Fatores de Crescimento Semelhante À Insulina
IGFBPs	Proteínas Ligantes do Fatores de Crescimento Semelhante À Insulina
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante À Insulina-1
GDF-9	Fator de Crescimento E Diferenciação-9
NGF	Fator de Crescimento Neural
KL	Kit Ligante
BPM-15	Proteína Morfogenética do Osso - 15
BPM-6	Proteína Morfogenética do Osso - 6
KGF	Fator de Crescimento Keratinócito
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
HE	Hematoxilina - Eosina
TGF- β	Fator de Transformação Beta

Lista de Símbolos

+	Adição
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
°C	Grau Celsius
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
<	Menor
μm	Micrômetros
μm ²	Micrômetros quadrados
mm	Milímetros
%	Porcentagem

Sumário

1 Introdução.....	19
2 Revisão de literatura.....	24
2.1 Égua como modelo reprodutivo para humanos.....	24
2.2 Desenvolvimento embrionário do ovário equino.....	25
2.3 Ciclicidade da égua.....	27
2.4 Dinâmica do ciclo estral e desenvolvimento folicular.....	29
2.5 Histologia ovariana.....	32
3 Artigos.....	36
3.1 Artigo 1.....	37
3.2 Artigo 2.....	70
4 Considerações Finais.....	88
Referências.....	90
Anexos.....	99

1 Introdução

As biotecnologias de reprodução assistida implementadas na equinocultura visam acelerar a seleção de indivíduos com características zootécnicas superiores. Estas características são determinadas em geral pelo desempenho em atividades atléticas, variando de acordo com a raça, finalidade e localização geográfica, sendo a aplicação das biotécnicas reprodutivas especialmente indicada em animais de elite inférteis e/ou mais velhos (PALMER et al., 2020). Dentre as espécies modelo para estudos relacionados a funcionalidade reprodutiva em animais domésticos, a espécie equina apresenta grande relevância, sendo considerada um modelo “duplo propósito, duplo benefício” para comparação inclusive com humanos (GINTHER et al., 2005; GINTHER et al., 2012; GASTAL et al., 2011; ALVES et al., 2016; CARNEVALE et al., 2020; Gastal et al., 2020; BENAMMAR, 2021). Neste contexto, os estudos reprodutivos na espécie equina possuem também uma relevância como modelo experimental para avançar na compreensão dos efeitos do envelhecimento reprodutivo na fertilidade humana (ALVES et al., 2017).

Estudos comparativos reportam estas similaridades nos eventos reprodutivos entre a espécie equina e humana, tais como: i) dinâmica folicular (GASTAL et al., 2011; GINTHER, 2012), (ii) eventos endócrinos durante o ciclo reprodutivo (GINTHER et al., 2005; MIHM et al., 2008), (iii) efeito do envelhecimento na foliculogênese e no perfil oocitário (CARNEVALE, 2008), (iv) disfunção da ovulação (BASHIR et al., 2016) e por fim na (v) dinâmica de folículos pré-antrais (ALVES et al., 2016). Telfer e Zelinski (2013), afirmam que a investigação de um modelo animal adequado para a pesquisa comparativa da população, densidade e distribuição de folículos pré-antrais tem sido a ênfase principal nas pesquisas translacionais relacionadas aos ovários. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias na manipulação de tecido ovariano equino que permitam o armazenamento de folículos pré-antrais pode maximizar a eficácia das metodologias de avaliação da qualidade do tecido ovariano, fornecendo soluções para enfrentar problemas de infertilidade e manter a capacidade reprodutiva na prática médica (GOSDEN; NAGANO, 2002).

A recuperação de tecido ovariano é uma etapa crucial afim de salvaguardar a qualidade do material biológico que será submetido a manipulação ovariana. As amostras teciduais podem ser recuperadas de diversas maneiras: obtidas em abatedouros *post mortem* (GOMES et al., 2015) e/ou procedimentos cirúrgicos [laparotomia (LOESCH; RODGERSON, 2003), laparoscopia (RAGLE et al., 1996) e colpotomia (TATE et al., 2012)] os quais são considerados procedimentos irreversíveis devido a remoção do ovário. Outra técnica que pode ser utilizada para a recuperação tecidual é o método de coleta de biopsia de tecido ovariano *in vivo* (HAAG et al., 2013), o qual tem se tornado uma alternativa promissora para fins experimentais e de diagnóstico. Independentemente da fonte do tecido ovariano recuperado, alguns aspectos críticos para a definição da qualidade e quantidade da população folicular nas amostras utilizadas devem ser prioritariamente considerados, como a idade dos animais (ALVES et al., 2017), a estacionalidade reprodutiva (ALVES et al., 2016), e a fase do ciclo estral (HAAG et al., 2013).

O ovário equino apresenta uma arquitetura distinta das demais espécies de mamíferos domésticos, em especial a presença da fossa ovulatória e a disposição das zonas cortical e medular, que nesta espécie apresenta a porção cortical rica em folículos ovarianos na porção interna do ovário, enquanto a região medular, composta por vasos e nervos se localiza na porção externa do ovário (WALT et al., 1979; GINTHER, 1992). Os ovários apresentam como função prioritária a produção de gametas femininos (oócitos) e produção endócrina de hormônios reprodutivos. A produção de gametas começa na fase embrionária, com a migração das células germinativas primordiais para a crista gonadal primitiva onde se multiplicam (CURRAN et al., 19997). Posteriormente, com o início da divisão meiótica e o processo de diferenciação gonadal estas células passam a serem chamadas de ovogônias e ficam retidas no estágio de prófase I (CURRAN et al., 19997; NAVES et al., 2008).

Após o nascimento, a fêmea equina, assim como as fêmeas das diferentes espécies mamíferas, apresenta uma população finita de folículos (MORAES et al., 2016). Os folículos são compostos por um oócito circundado por células da granulosa e células da teca, podendo ser divididos em duas categorias (pré-antrais e antrais) (GREEN et al., 2016). Durante o seu desenvolvimento dentro do ambiente ovariano, os folículos passam por um processo denominado de foliculogênese que compreende as etapas de ativação folicular, crescimento, maturação até o momento da ovulação,

onde um oócito maduro apto a ser fecundado será obtido (GILCHRIST et al., 2006; GILCHRIST et al., 2008). Contudo, somente uma pequena parcela dos folículos ovarianos será ovulada (0,1%), com a grande maioria da população folicular perdida por um processo fisiológico denominado atresia folicular (HSUEH et al., 1994). Neste sentido, a compreensão da dinâmica folicular, em se tratando principalmente dos folículos pré-antrais é de suma importância para a definição da qualidade tecidual antes da manipulação de tecido ovariano por meio de biotecnologias reprodutivas. Diversas técnicas de avaliação da qualidade do tecido ovariano têm sido empregadas, como a histologia clássica, microscopia de fluorescência, corantes vitais, microscopia eletrônica de transmissão, PCR, entre outras (GASTAL et al., 2020).

Sob esse aspecto, a histologia é uma técnica clássica de custo relativamente baixo para avaliação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano. Esta metodologia, possibilita com grande eficiência, caso realizada de maneira adequada, a avaliação de uma série de parâmetros relacionados a qualidade do tecido ovariano (por exemplo, morfologia, estágio de desenvolvimento, densidade folicular, densidade estromal, etc.), ou ainda a observação das alterações morfológicas dessas células à medida que transitam de um estado pavimentoso para um estado cúbico durante o processo de ativação folicular (MATOS et al., 2007). Portanto, para garantir a eficácia das técnicas de manipulação ovariana, é necessário conduzir uma análise histológica que assegure a integridade morfológica do folículo pré-antral e a preservação da morfologia do tecido estromal (GASTAL et al., 2020; AGUIAR et al., 2020). Para a eficiência do processo de histologia clássica, alguns pontos críticos precisam ser levados em consideração, com destaque a etapa de fixação, processo crucial durante o processamento histológico, a qual pode ter um impacto significativo na qualidade do tecido e comprometer a análise morfológica dos folículos pré-antrais (GASTAL et al., 2020).

Os fixadores histológicos têm como principal objetivo a preservação da morfologia das estruturas celulares fundamentais. Desta forma, a seleção apropriada da solução de fixação é de suma importância para garantir uma avaliação precisa do tecido ovariano, com o intuito de evitar a autólise do tecido, bem como a coagulação ou endurecimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). E isso está correlacionado principalmente à escolha da solução fixadora (SANTOS et al., 2012), bem como à duração do processo de fixação, como evidenciado por Búfalo et al. (2016). Desta forma, torna-se imprescindível estabelecer um método de fixação adequado, a fim de

minimizar potenciais danos críticos à morfologia celular do tecido ovariano durante o processo histológico (CULLING et al., 1985; SANTOS et al., 2012).

Ao analisar a literatura, diversos fixadores têm sido utilizados com grande variação dos resultados obtidos em se tratando de tecido ovariano fresco (Para maiores detalhes, consultar tabela 1 no artigo técnico). Neste contexto, grande parte dos estudos histológicos utilizam a solução fixadora Bouin para avaliar a morfologia de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino. No entanto, uma desvantagem da solução Bouin é seu preparo laborioso e a utilização do ácido pícrico em sua formulação, o qual impregna a amostra com uma coloração amarelada, e posteriormente requer sucessivas lavagens para obter-se uma melhor coloração do tecido (AZIZ et al., 2023). Outro fixador frequentemente utilizado é a solução Carnoy, fixador com rápida ação, que mantém a integridade do tecido ovariano, além de preservar a morfologia nuclear e reter glicogênio. No entanto, o uso dos fixadores mencionados acima não é compatível com técnicas de imunohistoquímica (IHC), que possui a vantagem de avaliar a expressão de importantes proteínas intracelulares (BHAT; HUSSEIN, 2021). Neste sentido, o uso do paraformaldeído também é amplamente utilizado como solução fixadora na avaliação histológica de folículos pré-antrais (AGUIAR et al., 2016; GASTAL et al., 2017). Possui como características ser eficiente na estabilização de proteínas, na preservação de estruturas celulares e de ácidos nucleicos, além disso, é compatível com técnicas de IHC (BHAT; HUSSEIN, 2021; HOBRO; SMITH, 2017). Para a escolha da solução fixadora para utilização no processamento histológico, deve-se considerar algumas das seguintes características: preservação das estruturas teciduais fidedignas ao tecido fresco, ser economicamente viável, apresentar segurança para a manipulação laboratorial e possuir baixo impacto ambiental. Desta forma, uma alternativa promissora é a utilização de etanol 70% como fixador (SANTOS et al., 2012), além de ser um fixador com baixo custo de produção, a solução pode preservar algumas proteínas, ideal para ser utilizado em amostras que posteriormente serão submetidas a técnicas de imunofluorescência (BHAT; HUSSEIN, 2021).

Nesse contexto, o objetivo da presente tese foi avaliar o efeito de diferentes fixadores para utilização em tecido ovariano equino, considerando o etanol 70% por curto tempo de exposição (ST-EtOH, 45 minutos) como um fixador alternativo em comparação com os fixadores clássicos Carnoy e paraformaldeído a 4% em diferentes tempos de fixação (6 horas, 12 horas). Os parâmetros avaliados incluíram a

morfologia e os estágios de desenvolvimento dos folículos pré-antrais, as densidades foliculares e de células estromais, bem como os diâmetros foliculares e nucleares de oócitos em tecido ovariano equino.

Durante a execução do experimento, foi possível atuar diretamente na interlocução da pesquisa como instrumento de ensino junto aos estudantes de graduação em veterinária, contribuindo por meio de metodologias ativas de ensino. Essas metodologias permitem que os alunos desempenhem um papel central no processo de aprendizagem demonstrando envolvimento ativo e investigativo (CFMV, 2012). Essas abordagens capacitam o estudante de graduação a adquirir habilidades essenciais para a sua formação, contribuem para a construção de conhecimento científico e os encorajam a superar os padrões convencionais, promovendo o desenvolvimento do pensamento crítico (BELOTTI; FARIA, 2010). Assim, foi possível a construção de um segundo estudo demonstrando a experiência da utilização das metodologias ativas com o intuito de aprimorar a compreensão dos procedimentos de manipulação de tecido ovariano equino, e proporcionar aos estudantes uma percepção mais abrangente das aplicações práticas e científicas realizadas nessa área.

2 Revisão de literatura

2.1 Égua como modelo reprodutivo para humanos

Inúmeras biotecnicas de reprodução assistida são utilizadas para superar a infertilidade na espécie humana. No entanto, modelos animais são necessários para estudos específicos na área da reprodução devido à preocupação ética para a realização e o desenvolvimento de novas técnicas (CARNEVALE, 2008; BENAMMAR et al., 2021). Desta forma, diferentes espécies [primatas (EINSPANIER; GORE, 2005), roedores (WALTERS et al., 2012), bovinos (ADAMS; PIERSON, 1995) e equinos (CARNEVALE, 2008)] são utilizadas em busca de um modelo de estudo ideal da função folicular e do envelhecimento reprodutivo (CARNEVALE, 2008).

A espécie equina tem sido apontada como um modelo reprodutivo apropriado para o estudo do desenvolvimento folicular em humanos (CARNEVALE, 2008). Em contraste com outras espécies domesticas, as éguas são regularmente mantidas até uma idade avançada (≥ 20 anos). Após este período, suas funções reprodutivas passam por alterações de maneira análoga aos humanos, e desta forma, possibilitando o entendimento sobre o envelhecimento oocitário (CARNEVALE et al., 2020; BENAMMAR et al., 2021).

A partir de estudos comparativos entre a espécie equina e humana, observaram-se similaridades nos eventos reprodutivos. Estas similaridades abrangem diversos aspectos, como: (i) eventos endócrinos durante o ciclo reprodutivo (GINTHER et al., 2005; MIHM et al., 2008), (ii) efeito do envelhecimento na foliculogênese e no perfil oocitário (CARNEVALE, 2008), (iii) dinâmica folicular (GASTAL et al., 2011; GINTHER, 2012), (iv) disfunção da ovulação (BASHIR et al., 2016) e na (v) dinâmica de folículos pré-antrais (ALVES et al., 2016). Assim, essas pesquisas desempenham um papel crucial na ampliação da compreensão dos processos reprodutivos, destacando especialmente a viabilidade da utilização da égua como modelo para estudos comparativos sobre a foliculogênese.

2.2 Desenvolvimento embrionário do ovário equino

Nos mamíferos, o ovário desempenha duas principais funções críticas para a atividade ovariana: fonte de células germinativas e a geração de moléculas bioativas, especialmente hormônios sexuais esteroides (estrogênio e progesterona) e fatores de crescimento (EDSON et al., 2009). Na espécie equina, o ovário possui uma arquitetura única quando comparado a outras espécies de mamíferos domésticos. Na estrutura ovariana destaca-se a presença da fossa ovulatória, além de alterações significativas da disposição das zonas cortical e medular, é observado um estroma fibroso abundante, e frequentemente a presença de tecido adrenocortical ectópico durante a fase fetal (MCENTEE, 1993; MORAES et al., 2016). Além disso, no estudo de Moraes et al. (2016), foi descrito que a diferença morfológica entre as camadas cortical e medular nos ovários fetais equinos já se torna histologicamente evidente no intervalo de 150 a 179 dias de gestação. Em síntese, a porção cortical, rica em folículos ovarianos, é encontrada na região interna do ovário, enquanto a região medular, composta por vasos e nervos, está localizada na parte externa do órgão (WALT et al., 1979; GINTHER, 1992).

As características morfológicas mencionadas não impactam a funcionalidade dos ovários, que são constituídos por folículos, os quais representam as unidades funcionais básicas intraovariana (HSUEH et al., 2015). Neste contexto, ao se desenvolverem no ambiente ovariano, os folículos passam por um processo conhecido como foliculogenese, o qual compreende as etapas de ativação folicular, crescimento e maturação oocitária até atingirem a ovulação (GILCHRIST et al., 2006; GILCHRIST et al., 2008). O processo de formação dos gametas inicia-se durante o período fetal, a diferenciação gonadal ocorre entre 39 e 45 dias de gestação (GONZÁLEZ-ÂNGULO et al., 1971; MERCHANT-LARIOS, 1979). Neste processo, as células germinativas primordiais separam-se do epitélio do saco vitelino e migram pelo mesentério em direção à crista gonadal primitiva, onde se multiplicam formando aglomerados de células germinativas (CURRAN et al., 1997; RIMON-DAHARI et al., 2016). Posteriormente, entre 75 e 160 dias de gestação, essas células entram em divisão meiótica, originando os oócitos, e essas células ficam detidas em estágio de

prófase I (GINTHER, 1979; RIMON-DAHARI et al., 2016). No decorrer desse processo, as células germinativas primordiais são cercadas por células pré-granulosas, resultando na formação dos folículos primordiais (RIMON-DAHARI et al., 2016). Ainda, conforme a gestação progride, é possível notar uma redução gradual na quantidade de folículos primordiais no ambiente ovariano, resultando na estabilização da reserva de folículos pré-antrais (MORAES et al., 2016).

Durante o período de puberdade, que geralmente ocorre em média entre 12 e 15 meses em éguas, embora as éguas normalmente atinjam a maturidade sexual entre 12 e 24 meses de idade, a manifestação regular da atividade cíclica só se torna evidente a partir dos 2 anos (GINTHER, 1979; WESSON; GINTHER 1981; Inglaterra, 2005). Além disso, o início da maturidade sexual e reprodutiva pode ser influenciado por fatores como raça, genética, condições nutricionais e de manejo, e até mesmo o fotoperíodo (MCKINNON et al., 2011).

Neste sentido, durante o período da puberdade, inicia-se um processo de transição dos folículos primordiais de um estado inativo para um conjunto crescente de folículos ativos (GINTHER, 1979; WESSON; GINTHER 1981). Ao longo dos 2 a 10 meses de vida, a atividade folicular foi caracterizada por um aumento contínuo no diâmetro médio do folículo (aproximadamente 6 para 10 mm) e no número médio de folículos (variando de 3 para 17) entre o 2º o 5º mês de idade (Nogueira e Ginther, 2004). Nogueira e Ginther (2004), relatam em seu estudo que a pesar de haver um breve período de estabilização da atividade folicular durante os meses de inverno, houve uma retomada do crescimento folicular após os 7 meses de idade, culminando no início da primeira temporada ovulatória na primavera. As variações na atividade folicular ao longo do primeiro ano de vida apresentam uma correlação positiva com as mudanças nos níveis de gonadotrofinas circulantes, indicando a influência reguladora da temporada na atividade gonadotrópica e folicular desde os estágios iniciais da vida das éguas (Nogueira e Ginther, 2004; DONADEU; PEDERSEN, 2008). O crescimento folicular antes da puberdade foi caracterizado pela formação de ondas foliculares em menor escala, no entanto, essas ondas não foram associadas a picos significativos de FSH circulante (DONADEU; PEDERSEN, 2008).

Em síntese, essa reserva de gametas na forma de folículos pré-antrais constitui um recurso finito disponível ao longo da vida reprodutiva. E para explorar plenamente esse potencial, é necessário compreender diversos aspectos anatômicos e fisiológicos associados ao funcionamento ovariano (ALVES et al., 2016). Além disso,

o entendimento desses aspectos estabelece uma base essencial para a pesquisa sobre a reserva folicular em éguas jovens.

2.3 Ciclicidade da égua

O equino é caracterizado por ser uma espécie poliéstrica sazonal monovulatória, cuja temporada reprodutiva tem início na primavera, marcada pelo aumento da luz natural, elevação da temperatura e uma maior disponibilidade de alimento (NAGY et al., 2000). A dinâmica dos folículos antrais em equinos tem sido extensivamente estudada, abordando a influência das diferentes estações do ano e fases cíclicas em comparação com o anestro (NAGY et al., 2000; DONADEU; WATSON, 2007). Ao longo da temporada de reprodução, as éguas ovulam aproximadamente em intervalos de 22 dias, e o ciclo reprodutivo equino pode ser categorizado em períodos distintos com base na receptividade sexual (estro *versus* diestro) ou fisiológico (fase folicular *versus* fase lútea) (HOPKINS; ALTHOUSE, 2003). Contudo, em certas éguas, a ciclicidade só pode ser detectada exclusivamente através de acompanhamento folicular por meio de palpação transretal em conjunto com a ultrassonografia, uma vez que as expressões comportamentais não são aparentes, configurando o fenômeno conhecido como "cio silencioso" (HOPKINS; ALTHOUSE, 2003; ROMANO et al., 1998). Em síntese, um ciclo ovariano corresponde ao processo de maturação e ovulação de um único folículo dominante ao longo do estro, seguido pela manutenção de um corpo lúteo funcional durante a fase de diestro (CURRY et al., 2007).

Neste contexto, o estro corresponde ao período em que a égua manifesta receptividade sexual aos avanços de um garanhão (CURRY et al., 2007). O comportamento de estro é desencadeado pelo aumento nos níveis de estradiol proveniente do folículo dominante em desenvolvimento, e na ausência de progesterona (HOPKINS; ALTHOUSE, 2003). No ciclo estral equino, a seleção folicular compreende uma complexa interação entre gonadotrofinas pituitárias e hormônios ovarianos (GINTHER et al., 2001). A primeira onda folicular do ciclo inicia no diestro, aproximadamente 7-8 dias após a ovulação, com o surgimento de um grupo de folículos (GINTHER et al., 2004). Posteriormente, há um período de crescimento onde todos os folículos aumentam de tamanho de forma igualmente exponencial em torno de 6-7 dias, o folículo que se tornará dominante continua com o

seu desenvolvimento, enquanto os folículos subordinados menores regredem (GASTAL et al., 1994; GINTHER et al., 2004). Esses eventos relacionados ao estímulo ao crescimento inicial do folículo dominante, são impulsionados pelo hormônio folículo estimulante (FSH) produzido pela glândula pituitária anterior (GINTHER et al., 2001). Os níveis de FSH atingem o pico quando o folículo dominante tem cerca de 13 mm, e à medida que primeiramente a inibina e depois o estradiol são produzidos pelos folículos maiores dentro da onda folicular, os níveis de FSH vão diminuindo (GASTAL et al., 1994; GINTHER et al., 2001). Desta forma, a duração do estro está correlacionada ao tamanho do folículo ao final do diestro, à taxa de crescimento do folículo dominante e ao tamanho final do folículo antes da ovulação, que em média este período é de 6,5 dias, podendo variar de 4,5 a 8,5 dias (HOPKINS; ALTHOUSE, 2003). A ovulação ocorre de 24 a 48 horas anteriormente ao final da fase estral, devido a um aumento na progesterona proveniente do corpo lúteo em desenvolvimento o qual é responsável pelo fim do estro comportamental (GINTHER, 1979; HOPKINS; ALTHOUSE, 2003).

Durante os meses de inverno, ocorre uma diminuição significativa da atividade ovariana, caracterizada pelo fenômeno conhecido como anestro sazonal, que é modulado por diversos sistemas neuronais inibitórios, além de fatores externos e internos, tais como fotoperíodo, nutrição, temperatura e o ritmo circanual endógeno (GINTHER, 1979; HOPKINS; ALTHOUSE, 2003). No período de anestro em éguas, há uma redução na produção e na interação de vários hormônios fundamentais para a ciclicidade ovariana. O Hormônio Liberador de Gonadotropina (GnRH) é liberado em pulsos menos frequentes e menos intensos pelo hipotálamo, diminuindo a estimulação da glândula pituitária (GINTHER, 1979; HART et al., 1984; MCKINNON et al., 2011). Como resultado, a produção de gonadotropinas, como o Hormônio Luteinizante (LH) e FSH, é reduzida (HART et al., 1984). Isso afeta negativamente a produção de estrógeno pelos ovários, essencial para o desenvolvimento folicular e expressão de comportamentos de estro (GINTHER, 1979; DONADEU; WATSON, 2007). Além disso, a produção de progesterona, necessária para manter o útero receptivo à gestação, é diminuída, contribuindo para a inatividade ovariana (GINTHER, 1979).

A estação anovulatória foi categorizada em três fases distintas: a transição de outono, que indica a redução da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário; o anestro profundo, caracterizado pelo período de menor atividade reprodutiva, durante o inverno; e a transição de primavera, marcando uma recrudescência que antecede o

reinício da atividade ovulatória (NAGY et al., 2000). Conforme as éguas adentram o período de anestro e a função ovariana diminui, é comum observar uma redução no tamanho geral dos ovários, conferindo-lhes a indesejada sensação de rigidez caracterizada pela inatividade cíclica dessa fase (VAN NIEKERK et al., 1973). Por fim, esses eventos não ocorrem de maneira repentina, pelo contrário, requer no mínimo 60 dias ou mais para que a função ovariana seja completamente interrompida (MCKINNON et al., 2011).

Durante um ciclo regular, esses eventos são coordenados pela regulação endócrina para ocorrerem de forma adequadamente sincronizada (GINTHER, 1992). O sistema reprodutivo passa por alterações cíclicas, principalmente no colo do útero, junção útero-tubária e istmo do oviduto, em preparação para a deposição e transporte do esperma, facilitando a fertilização no oviduto e a recepção do óvulo fertilizado no útero para estabelecer uma gestação (CURRY et al., 2007). Entretanto, em ciclos irregulares comumente observados durante as transições de primavera e outono, ao entrar e sair do estado de anestro, podem ocorrer alterações nas funções do sistema endócrino, levando a possíveis problemas reprodutivos (GINTHER, 1992).

2.4 Dinâmica do ciclo estral e desenvolvimento folicular

Durante a temporada reprodutiva na primavera e no verão, a duração média do ciclo estral é de cerca de 21-22 dias, dividido em períodos de estro (5 - 7 dias) de diestro (14 - 15 dias) (AURICH, 2011). O ciclo sazonal de atividade reprodutiva na espécie equina é influenciado por um ritmo circanual endógeno que é regulado por diversos elementos ambientais, como o fotoperíodo (SHARP et al., 1975). Desta forma, a regulação neuroendócrina da atividade reprodutiva pelo fotoperíodo é mediada pela melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal, o qual exerce uma função inibitória na atividade ovulatória através da regulação do eixo hipotálamo-hipófise (GUILLAUME et al., 1991; FITZGERALD et al., 2000; COELHO et al., 2023).

Sendo assim, quando há o aumento de luminosidade, a informação luminosa é transmitida das células da retina do olho via nervo óptico para o núcleo supraquiasmático no hipotálamo anterior (STABENFELDT; EDQVIST, 1996). A resposta desse núcleo é transmitida por meio do núcleo paraventricular ao gânglio cervical superior via fibras do sistema nervoso autônomo, chegando finalmente á

glândula pineal, onde a melatonina é produzida exercendo uma influência crítica na modificação da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (STABENFELDT; EDQVIST, 1996). Durante a estimulação luminosa, a função da glândula pineal é inibida, diminuindo a produção de melatonina que por sua vez exerce influência juntamente com uma rede neuronal quem envolvem inúmeros neurotransmissores atuando em pontos específicos situados no hipotálamo (MALPAUX et al., 1999; GINTHER, 1992).

A redução na concentração plasmática de melatonina resulta em um aumento da liberação do GnRH hipotalâmico (CLEAVER et al., 1991). Esse aumento no GnRH estimula a hipófise a secretar os hormônios gonadotróficos LH e FSH, os quais, por sua vez, promovem a produção de estrogênio e progesterona pelos ovários (GINTHER, 1992). Desta forma, os folículos em desenvolvimento são responsáveis pela produção predominante de estrogênio durante a fase pré-ovulatória do ciclo, enquanto a fase de diestro, pós-ovulatória, é caracterizada pela predominância da progesterona proveniente do corpo lúteo (GINTHER, 1992).

A partir da produção de estradiol pelo folículo ovariano dominante, há um feedback negativo no hipotálamo, levando a uma redução na liberação de FSH (SATO et al., 1977). Além disso, alguns fatores de crescimento locais são considerados cruciais e interagem no processo de seleção e diferenciação do folículo dominante, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs) (MONNIAUX et al., 1997). O folículo dominante adquire autonomia, enquanto os demais sofrem apoptose (GINTHER, 2000). Concomitantemente, há um aumento na secreção hipotalâmica de kisspeptina e GnRH, o que resulta em uma elevação na liberação de LH pela hipófise, frequentemente coincidindo com o ápice das concentrações de estradiol (SATO et al., 1977; GINTHER, 1992). A ovulação é precedida por esse aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol, FSH e LH (GINTHER, 1992).

A foliculogenese ou o processo de desenvolvimento folicular tem início durante o período fetal e pode ser caracterizada como o conjunto de eventos que envolvem a formação, crescimento e maturação dos folículos, iniciando-se com a formação do folículo primordial e alcançando o estágio de folículo de Graaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nesse processo, as células germinativas primordiais são

envolvidas por células pré-granulosas, culminando na formação dos folículos primordiais (GONZÁLEZ-ÂNGULO et al., 1971; MERCHANT-LARIOS, 1979; RIMON-DAHARI et al., 2016). Desta forma, em uma fase denominada ativação folicular primordial, alguns folículos primordiais deixam a reserva de folículos quiescentes para iniciar o desenvolvimento folicular que abrangem os estágios de transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório (ARAÚJO et al., 2014). Além disso, a ativação folicular é caracterizada por modificações morfológicas nas células da granulosa, com a transição de uma forma achatada para uma forma cuboidal acompanhada pela retomada da proliferação celular e pelo início do crescimento do oócito (VAN DEN HURK et al., 1997). Posteriormente a ativação folicular, os folículos primordiais iniciam uma transição progressiva, adquirindo células da granulosa cuboidais e tornando-se folículos transicionais e primários, este último, apresenta uma camada completa de células cuboides ao redor do oócito (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997; ARAÚJO et al., 2014). Por conseguinte, os folículos secundários são caracterizados morfológicamente a partir da disposição de uma segunda camada de células da granulosa, além da deposição inicial da zona pelúcida, formação de grânulos corticais citoplasmáticos no oócito, início da formação da camada de células da teca, síntese de mRNA oocitário, e por fim, a capacidade de resposta à gonadotrofina (FAIR, 2003). Ainda, a transição para o folículo terciário é marcada pela contínua proliferação e diferenciação das células que ao redor do oócito, formando a teca interna e externa, a lâmina basal e as células do *cumulus*, além da formação da cavidade antral preenchida por fluído (FAIR, 2003; RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

De forma sucinta, o desenvolvimento dos folículos no ovário de mamíferos é influenciado por gonadotrofinas, somatotrofinas e fatores intraovarianos (FAIR, 2003). Diversos fatores de crescimento produzidos por células foliculares desempenham um papel na modulação dos efeitos hormonais e também na regulação do desenvolvimento folicular (SOUSA et al., 2008). Dentre os principais peptídeos envolvidos no processo de proliferação e diferenciação folicular estão: O Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1), Fator de crescimento neural (NGF), Kit Ligante (KL), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Proteína Morfogenética do Osso - 15 e 6 (BMP-15 e BPM-6), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator de Crescimento Keratinócito (KGF), Fator de Transformação Beta (TGF- β), Neurotrofinas, Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e

ativina (SOUSA et al., 2008). Inúmeros fatores regulam o crescimento folicular e determinam a aquisição final da competência oocitária (FAIR, 2003). Por fim, a compreensão desses sistemas de regulação e da interação entre fatores metabólicos externos e internos é essencial para a obtenção de oócitos viáveis, fundamentais para a aplicação de técnicas de reprodução assistida (SOUSA et al., 2008).

2.5 Histologia ovariana

A partir da avaliação histológica do tecido ovariano equino, é possível descrevê-lo como uma estrutura única em relação às outras espécies de mamíferos (KIMURA et al., 2005). Além da inversão da zona cortical e medular, os folículos desenvolvem-se centralmente no interior do ovário, que por sua vez é envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo resistente (KIMURA et al., 2005; YOON, 2012). Outro aspecto divergente da espécie equina, é a presença da fossa ovulatória, uma área concava de epitélio germinativo reconhecida por ser a única região que permite a liberação do oócito, ainda, estima-se que a presença da fossa ovulatória possa limitar a ocorrência de múltiplas ovulações (YOON, 2012).

No entanto, o processo de distribuição espacial, desenvolvimento dos folículos e suas migrações não ocorrem de maneira uniforme em todo o ovário (RILEY et al., 2001; FAIRE et al., 2015; HYDE et al., 2022). Isso resulta na heterogeneidade da população folicular, ocasionando uma considerável variação nos números e classes de folículos coletados em distintas amostras de tecido ovariano equino (ALVES et al., 2016; GASTAL et al., 2017). Essa diversidade e variação nos folículos podem ser atribuídas à dinâmica da plasticidade ovariana, uma característica que foi proposta tanto em mulheres (WOODRUFF; SHEA, 2011) quanto em éguas (ALVES et al., 2018). Hyde e colaboradores (2022) demonstraram em um estudo inédito que a distribuição da população de folículos pré-antrais em éguas é maior (média: 82.206 ± 50.022) do que inicialmente relatada, onde há influência da idade da égua na distribuição espacial e densidade de folículos morfológicamente normais e anormais, além de efeitos na distribuição populacional. Nesse estudo, eles concluíram que a análise detalhada da distribuição desses folículos pode aprimorar estudos reprodutivos e procedimentos relacionados à plasticidade ovariana, além disso, os resultados obtidos indicam possíveis áreas-alvo para obter maior densidade de

folículos desejados, fornecendo insights para futuras pesquisas sobre a fisiologia ovariana, foliculogênese e migração folicular.

Além da distribuição espacial dos folículos pré-antrais no ovário, outro fator importante que pode influenciar tanto o número quanto a qualidade dessas estruturas é o efeito da idade (ALVES et al., 2018; HYDE et al., 2022). Alves et al (2018), mostrou que os folículos pré-antrais em éguas tendem a se agrupar próximo ao centro geométrico do ovário, e que o envelhecimento contribui para a dispersão desses folículos através do córtex ovariano. Além disso, o processo de envelhecimento também afeta negativamente a população, densidade e morfologia folicular (ALVES et al., 2017). É de suma importância a compreensão destes mecanismos e a caracterização dos impactos da idade na reserva ovariana para que sejam utilizados biotécnicas de reprodução assistida mais específicas para a recuperação tecidual e de folículos pré-antrais.

A avaliação tecidual por meio da histologia nos fornece inúmeras informações sobre a reserva folicular e permite a realização de estudos com aplicações práticas na área de reprodução assistida. Para aproveitar esse potencial, é essencial ter uma compreensão dos aspectos anatomofisiológicos associados ao ovário (ALVES et al., 2016; BENAMMAR et al., 2021). Durante as diferentes fases reprodutivas, o tecido ovariano passa por mudanças estruturais profundas principalmente em relação a área de estroma em virtude da dinâmica dos folículos pré-antrais e do corpo lúteo (ALVES et al., 2016). Em síntese, Alves e colaboradores (2016) investigaram a influência da fase reprodutiva (anestro vs. diestro) e das estruturas ovarianas (folículos antrais e corpo lúteo) na qualidade, distribuição de classes, número e densidade de folículos pré-antrais e densidade de células estromais. Os resultados indicaram que durante a fase diestral, houve uma melhoria positiva na qualidade dos folículos pré-antrais, na distribuição das classes e nas densidades das células foliculares e estromais. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre a área das estruturas ovarianas e as densidades de folículos e células estromais. A presença de um corpo lúteo ativo também teve um impacto positivo na qualidade dos folículos pré-antrais, bem como nas densidades folicular e estromal. Esses achados ressaltam a influência benéfica de fatores específicos do ciclo reprodutivo na qualidade e na dinâmica do tecido ovariano equino.

Sendo assim, podemos afirmar que a histologia é considerada uma técnica padrão ouro para a avaliação de tecidos, apresentando inúmeras vantagens, como custo relativamente baixo e a capacidade de preservar amostras de lâminas por um longo período de tempo (GASTAL et al., 2020). Além disso, a histologia clássica é uma técnica que permite avaliar a morfologia do citoplasma e núcleo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano, na qual, é possível observar mudanças morfológicas nas células da granulosa que transitam de um estado pavimentoso para um estado cúbico durante a ativação folicular (MATOS et al., 2007). Sendo crucial para análises quantitativas, pois permite a avaliação de um grande número de folículos (MATOS et al., 2007). No entanto, esta metodologia possui a limitação à avaliação morfológica de estruturas ovarianas, sem análise da funcionalidade celular e tecidual (GASTAL et al., 2020).

Dessa forma, para assegurar a efetividade das técnicas de manipulação ovariana, é imprescindível realizar uma análise histológica que garanta a integridade morfológica do folículo pré-antral e a preservação da morfologia do tecido estromal (GASTAL et al., 2020; AGUIAR et al., 2020). Em síntese, a técnica de histologia clássica inclui etapas de fixação, desidratação, diafanização, infiltração, inclusão, microtomia e coloração das lâminas (MATOS et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). No processamento histológico, é crucial considerar alguns pontos críticos, sendo a etapa de fixação especialmente relevante durante a técnica histológica, pois pode impactar significativamente na qualidade do tecido e comprometer a análise morfológica dos folículos pré-antrais (GASTAL et al., 2020). Neste sentido, os fixadores histológicos visam primariamente preservar a morfologia das estruturas celulares essenciais. Portanto, a escolha apropriada da solução de fixação é de extrema importância para assegurar uma avaliação precisa do tecido ovariano, evitando a autólise, coagulação ou endurecimento do tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Isso está diretamente relacionado à seleção criteriosa da solução fixadora (SANTOS et al., 2012) e à duração do processo de fixação (BÚFALO et al., 2016).

Assim, é crucial estabelecer um protocolo de fixação adequado para minimizar possíveis danos à morfologia celular do tecido ovariano durante o processamento da amostra tecidual (CULLING et al., 1985; SANTOS et al., 2012). Os fixadores comumente utilizados para avaliação morfológica de folículos pré-antrais inclusos em

tecido ovariano equino são o paraformaldeído a 4% (AGUIAR et al., 2016), bouin (ALVES et al., 2015), formalina 10% (AGUIAR et al., 2017) e carnoy (BÚFALO et al., 2016). Além destes fixadores, o etanol a 70% tem sido utilizado como um agente fixador (SANTOS et al., 2012). Além de apresentar um custo de produção acessível, essa solução é capaz de preservar algumas proteínas, sendo ideal para amostras que serão submetidas posteriormente a técnicas de imunofluorescência (BHAT; HUSSEIN, 2021). Enquanto as colorações frequentemente utilizadas são hematoxilina-eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-hematoxilina), essa última oferece a vantagem de possibilitar a observação da zona pelúcida, da membrana basal e dos demais elementos foliculares, incluindo as células da granulosa, o citoplasma e o núcleo do oócito. (MATOS et al., 2007; GASTAL et al., 2020). Desta forma, a escolha do fixador, método de coloração, tempo de processamento e espessura da seção histológica são elementos cruciais que podem influenciar a qualidade morfológica dos folículos pré-antrais equinos inclusos no tecido ovariano (GASTAL et al., 2020)

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Ethanol, Carnoy, and paraformaldehyde as fixative solutions for histological evaluation of preantral follicles in equine ovarian tissue

Morgana A. Borges, Bruna R. Curcio, Gustavo D.A. Gastal, Luiza Gheno, Antonio S. Varela Junior, Carine D. Corcini, Carlos E.W. Nogueira, Francisco L.N. Aguiar, Eduardo L. Gastal.

Publicado na revista *Reproductive Biology* v. 23, n. 4, 2023.

Qualis em Medicina Veterinária: A2

Ethanol, Carnoy, and paraformaldehyde as fixative solutions for histological evaluation of preantral follicles in equine ovarian tissue

Morgana A. Borges^a, Bruna R. Curcio^a, Gustavo D.A. Gastal^b, Luiza Gheno^a, Antonio S. Varela Junior^c, Carine D. Corcini^a, Carlos E.W. Nogueira^a, Francisco L.N. Aguiar^d, Eduardo L. Gastal^e, *

^a *Department of Veterinary Clinics, College of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil*

^b *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay*

^c *Department of Comparative Animal Reproduction, Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil*

^d *Department of Veterinary Medicine, Sousa Campus, Federal Institute of Education, Science and Technology of Paraíba, Sousa, PB, Brazil*

^e *Animal Science, School of Agricultural Sciences, Southern Illinois University, Carbondale, IL, USA*

Running head: Effect of fixative solutions in equine ovarian tissue

* Corresponding author: *E-mail address:* egastal@siu.edu (Eduardo L. Gastal), Animal Science, School of Agricultural Sciences, Southern Illinois University, 1205 Lincoln Drive, MC 4417, Carbondale, IL, 62901, USA.

Abstract

The most adequate fixative solution for equine ovarian tissue is still to be determined as a tool to evaluate the improvement of methodological studies in assisted reproductive techniques and fertility preservation. This study aimed to evaluate a short-time ethanol 70% (ST-EtOH, 45 min) exposure as an alternative fixative compared with two classically fixatives [Carnoy's (CAR) solution and paraformaldehyde 4% (PFA)] at different fixation times (6 h, 12 h). The end points evaluated were morphology and classes of preantral follicles, follicular and stromal cell densities, and follicular and oocyte nuclear diameters in equine ovarian tissue. Ovaries ($n = 6$) from ovariectomized young mares were fragmented ($3 \times 3 \times 1$ mm; 20 fragments/ovary) and fixed in the tested treatments. Overall, a total of 11,661 preantral follicles were evaluated in 1,444 histological slides. The ST-EtOH similarly preserved the preantral follicle morphometry and stromal cell density compared to the PFA fixative, regardless of the exposure time. Nonetheless, the CAR fixative solution had the greatest percentage of normal preantral follicles and the highest stromal cell density among all treatments. In conclusion, Carnoy's solution must be preferred compared with ST-EtOH and PFA fixatives for studies concerning the cellular morphology of equine ovarian tissue. Moreover, ST-EtOH fixative is a good alternative for equine ovarian tissue when a quick histological evaluation is required instead of more time-consuming and expensive techniques. Additional studies concerning the impact of different fixatives on the ultrastructure of cellular populations and their compatibility with IHC and molecular techniques in equine ovarian tissue are warranted.

Keywords: Mare; Ovarian tissue quality; Fixative solution, Preantral follicle morphometry.

1. Introduction

Morphological evaluation of fresh ovarian tissue after harvesting should guarantee the maintenance of cellular and parenchymal tissue structural features to allow appropriate preservation of preantral follicle quality and follicular and stromal cell population and density before *ex vivo* manipulation [1,2]. To reach this goal, ovarian tissue processing through classical histology has been the most common approach to evaluating ovarian tissue quality with enclosed preantral follicles. In this regard, histological processing usually has a relatively low cost and allows for the long-lasting preservation of tissue samples. However, to allow for an efficient histological processing protocol, the choice of an appropriate fixative solution is critical. Currently, there is no universal fixation method for ovarian tissue of different species [3]. This fact might be due to the ovarian tissue consistency, composition, and fragment size as well as the source of the tissue (i.e., fresh tissue vs. manipulated tissues obtained after *in vitro* culture, cryopreservation, and transplantation), which are aspects that can influence the fixative solution to be chosen [2].

In the last decade, our research group has advanced knowledge concerning ovarian tissue characteristics and preantral follicles using the female horse as an appropriate comparative model for both humans and livestock species (for reviews, see [2,4]). The use of the horse for studies of early folliculogenesis supports the concept of a “dual-purpose and dual-benefit” animal model. Regarding equine ovarian tissue histological studies, different classical fixatives have been used with several protocols, such as Bouin [5], Carnoy (CAR; [6]), paraformaldehyde 4% (PFA; [7,8]), and formalin 10% [9] (see a thorough review in Table 1). As observed in the literature cited in Table 1, the most common fixative solution used for equine ovarian tissue has been Bouin’s solution. However, using Bouin’s solution has several drawbacks, such as (i) the limited access to picric acid from suppliers, (ii) the jeopardizing sample’s general aspects

(yellowish), and (iii) the lack of suitability/recommendation for follow-up techniques such as immunohistochemistry (IHC).

Carnoy solution is an alcohol-based fixative that effectively maintains ovarian tissue histological structures. Its composition [e.g., ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), chloroform (CHCl_3), and glacial acetic acid ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) (ratio 6:3:1)] provides a fast action with adequate nuclear preservation and glycogen retention [10]. However, Carnoy's solution is incompatible with IHC techniques. In contrast, another common fixative solution used for histological routine is paraformaldehyde ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$), an aldehyde-based fixative, also referred to as polyoxymethylene; this fixative has been used widely due to its ability to preserve cell structures, stabilize proteins and nucleic acids, and suitability for IHC techniques [11]. Nevertheless, the paraformaldehyde fixative has produced a large range of percentages of morphologically normal equine preantral follicles (Table 1). Regardless of the type of fixative solution for ovarian tissue of different species, the ideal solution should have the compatibility to preserve proteins, receptors, and enzymes during follow-up *in vitro* techniques (e.g., IHC technique) [3], besides having a low-cost production, worker security, and low environmental impact. Therefore, a promising alternative for ovarian tissue fixation is using 70% ethanol alone ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) [10,12,13], a common step applied during several fixation protocols. Indeed, the use of 70% ethanol alone has been shown to have fixative properties in glandular urinary tissue in humans [12] and bovine ovarian tissue [13], with contrasting results. Regardless of the fixative solution, potential ovarian tissue morphological distortions (e.g., cell retraction) may occur. Thus, investigations to determine the best fixative solution and adequate fixation time for histological protocols remain to be done. Hence, as studies comparing the quality of different fixative histological methods in equine ovarian tissue are scarce and produce controversial results [2,6], new studies are warranted considering different fixative solutions and times of fixation when using a standard ovarian fragment size.

The aims of this study were to (i) evaluate the use of only 70% ethanol as a fixative solution for direct and quick histological processing for a short time (ST-EtOH, for 45 min) and (ii) compare the ST-EtOH with classically used fixatives (CAR and PFA 4%) at different fixation times (6 h or 12 h) using an ovarian fragment size (3 x 3 x 1 mm) commonly used in *in situ* culture. The following end points were evaluated: morphology of preantral follicles, follicular class, follicular and nuclear diameters, nucleus-follicle diameter ratio, and follicular and stromal cell densities in equine ovarian tissue fragments.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Unless otherwise indicated, all chemicals used in the present study were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA).

2.2. Animals, ovaries, and experimental design

The research protocol (#12986-2021) was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (AEEC) of the Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Six crossbred mares 2–8 years old with body condition scores of 4–6 (on a scale from 1, thin, to 9, obese; [14]) were used. The ovaries ($n = 6$, one per mare) were collected through a unilateral ovariectomy [15]. After recovery, each ovary was cut in half, and the intermediary portion was chosen to harvest 20 fragments. A total of 120 ovarian fragments from 6 mares ($n = 20$ per ovary) were randomly distributed into five treatment groups as follows: (i) short-time ethanol 70% (ST-EtOH) [absolute alcohol + deionized water, 7:3 v/v; at room temperature (RT, 20–22°C)] transported for 45 min at 4°C, (ii) Carnoy's (CAR) fixative solution (absolute alcohol + chloroform + glacial acetic acid; 6:3:1) for 6 h (CAR 6h) at RT, (iii) CAR for 12 h

(CAR 12h) at RT, (iv) paraformaldehyde 4% (PFA) fixative solution [paraformaldehyde 4% + phosphate-buffered saline (PBS) for 6 h at RT] (PFA 6h), and (v) PFA for 12 h at RT (PFA 12h). After fixation, the fragments ($n = 4$ per treatment x 6 replicates/animals) were processed by classical histology and followed by evaluation of preantral follicles' morphology and number, follicular classes, follicle and nucleus diameters, nucleus-follicle volume ratio, and density of follicles and stromal cells.

2.3. Ovarian manipulation and sectioning

Immediately after surgical harvesting, the ovaries were washed for 10 sec in 70% alcohol and then washed twice in PBS to remove blood clots. Subsequently, adipose tissue and surrounding ligaments were removed. The ovaries were sectioned in halves to facilitate fragmentation. During ovarian fragmentation, any corpus luteum and large antral follicles were avoided, and the intermediary portion of the ovary (the most internal and richest area in preantral follicles in the cortical tissue) was targeted for tissue recovery to obtain the maximum number of preantral follicles possible according to the methodology established by our group [16]. Ovarian fragments were processed using a standard *in vitro* culture size (3 x 3 x 1 mm; L x W x H) [7,8,17] with the aid of toothless forceps and scalpel blades.

2.4. Histological processing

After the fixation protocols, the ovarian fragments were dehydrated using a graded series of alcohol, embedded in paraffin wax, and cut into 7- μ m serial sections. Samples were stained with Periodic Acid-Schiff (PAS) and counterstained with hematoxylin. Histology slides were analyzed using light microscopy (Nikon, Tokyo, Japan) at 400 $\times$ magnification. To avoid double

counting, every 5th histological section was evaluated to determine the number and classification of the preantral follicles [18]. A single operator unaware of the treatments performed the histological evaluation and classification of the follicles. Before evaluating all end points, a senior experienced operator briefly inspected a sample of slides and noticed no differences among the tested treatments regarding tissue and follicle fixation qualities located in the middle vs. edges of each histological section. Therefore, data considering the different areas of each histological section were not further considered in the study.

2.5. Morphological classification of follicles

The morphology of preantral follicles was evaluated according to Alves et al. [18]. Preantral follicles with a visible oocyte nucleus were classified as normal (follicle containing an intact oocyte surrounded by well-organized granulosa cells without pyknotic nucleus) or abnormal (disorganized granulosa cell layers detached from the basement membrane, cytoplasm shrinkage, and pyknotic nucleus) as previously described [19]. Concerning the follicular class, the follicles were classified as primordial (one single layer of flattened granulosa cells) and developing follicles comprising transitional (one single layer of flattened and cuboidal granulosa cells), primary (one single layer of cuboidal granulosa cells), or secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells, with a visible zona pellucida) follicular stages [20,21]. Every follicle with a visible oocyte nucleus was examined in each section in which it appeared and matched with the same follicle on adjacent sections to avoid double counting, thereby ensuring that each follicle was counted only once.

2.6. Follicular and nuclear diameters

Follicular and nuclear diameters were measured according to Aguiar et al. [22]. Only morphologically normal follicles were evaluated, using images captured by a digital camera (Olympus DP-72) coupled to a microscope (Nikon Eclipse 50i/55i Morrell Instrument Co., Inc., Melville, NY, USA), and the follicular and nuclear diameter measurements were taken using an image software (ImageJ v. 1.53s). The follicular diameter was measured from one edge to the other edge of the outer layer of granulosa cells. The nuclear diameter was measured from one edge of the nuclear envelope (karyote) to the other. Two perpendicular measurements were recorded for each diameter analysis, and the mean of these two values from each analysis was considered.

2.7. Follicular and stromal cell densities

To determine the preantral follicular density, first, the perimeter of each histological section was measured using the freehand selection tool in the ImageJ software to establish the fragment tissue area (cm^2). Then, follicular density was determined by the following formula according to Alves et al. [5]: follicular density = total number of preantral follicles (normal and abnormal combined) per section / ovarian section area (cm^2).

The follicular density was determined according to morphology (normal and abnormal) and classes (primordial and developing stages). Overall, 1080 evaluations for follicular density were performed throughout the experiment (9 sections per replicate; 36 sections per treatment). With respect to the stromal cell density, a total of 10% of the histological sections for each ovarian fragment were analyzed [18,23]. Three random fields ($50 \times 50 \mu\text{m} = 2,500 \mu\text{m}^2$) were selected, and the stromal cell nuclei within the fields were manually counted to calculate the mean

stromal cell density per area (2,500 μm^2) of an ovarian fragment. A single operator performed all assessments.

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Statistix statistical software version 10.0 (Analytical Software, Tallahassee, USA) or R software version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The normality and homoscedasticity of the data were evaluated using Kolmogorov–Smirnov and Levene’s tests, respectively. The follicle and nuclear diameters and stromal cell density data were log-transformed to attain normality. Comparisons of number of preantral follicles counted, follicle and nuclear diameters, nucleus-follicle volume ratio, and stromal cell density among treatments were performed by One-Way ANOVA test and post hoc comparisons with Tukey’s test, Dunn’s test, or the Holm–Sidak method, as appropriate. The Chi-squared test and the Marascuilo procedure were used to simultaneously test for differences in the percentage of morphologically normal follicles among treatments. The potential associations between stromal cell density and follicular parameters (follicle and nuclear diameter and nucleus-follicle volume ratio) were analyzed by Pearson’s correlation test and linear regression. The results were presented as the mean values for each data set $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical significance was defined at a probability level of $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Preantral follicle morphology and class distribution

Overall, a total of 11,661 preantral follicles were evaluated in 1,444 histological slides, and 5,776 tissue sections were produced from 120 fragments. As expected, high heterogeneity in the number of follicles per individual mare (Fig. 1A) and within treatments (Fig. 1B) was observed. Moreover, a dispersive follicular distribution was detected for each animal (replicate) within each treatment (Fig. 1B). These findings indicated the presence of unbiased samples strengthening the composition of each treatment.

A similar ($P > 0.05$) mean number of normal follicles regardless of follicular class was observed among fixative treatments (Fig. 2A); however, the number of abnormal primordial and overall (primordial and developing follicles combined) follicles was greater ($P < 0.05$ – 0.02 , respectively) in the ST-EtOH treatment compared to CAR 6h and CAR 12h (Fig. 2B).

The mean percentages of normal primordial and developing follicles are depicted (Fig. 3A). Overall, CAR 6h and 12h treatments had greater ($P < 0.05$) percentages of primordial and overall (primordial and developing follicles combined) morphologically normal follicles compared to the other treatments. A lower percentage ($P < 0.05$) of morphologically normal developing follicles was observed in ST-EtOH compared to all other treatments. Illustrative images of equine preantral follicles in different follicular classes processed with CAR fixative are shown (Fig. 3B–I).

3.2. Follicular and nuclear diameters

A total of 150 normal primordial follicles and 124 normal developing follicles were used to measure follicular and oocyte nuclear diameters. The oocyte nuclear diameter was larger ($P <$

0.05), and the follicle diameter was smaller ($P < 0.05$) in primordial and developing follicles in the CAR 6h and CAR 12h compared to the other treatments (Fig. 4A–D). Therefore, the mean nucleus-follicle diameter ratio for primordial and developing follicles was greater ($P < 0.05$) in the CAR 6h and CAR 12h compared to the other treatments (Fig. 5A, B).

3.3. Follicular and ovarian stromal cell densities

A lower ($P < 0.05$) total follicular density was observed in PFA fixative regardless of the time of exposure (Fig. 6A). Illustrative images of equine preantral follicular density are shown (Fig. 6B). The treatment PFA 6h had the lowest ($P < 0.05$) total follicular density compared with the other treatments, but it was similar ($P > 0.05$) to the PFA 12h treatment (Table 2). Moreover, similar ($P > 0.05$) densities were observed among CAR, ST-EtOH, and PFA 12h treatments. A heterogeneity pattern in the follicular density was observed when considering the fragments evaluated within the same animal regardless of treatment (0.0 ± 0.0 to 311.8 ± 69.8 follicles/cm²) and within each treatment (15.1 ± 5.3 to 311.8 ± 69.8 follicles/cm²; Table 2). Follicular densities considering follicular morphology and follicle class were also evaluated (Supplementary Table 1). Compared with all other treatments, CAR 6h had greater ($P < 0.05$) mean normal follicle density, but it was similar to CAR 12h. Both PFA treatments had lower ($P < 0.05$) developing follicle densities compared with all other treatments.

When comparing fixatives, regardless of the time of exposure, a greater ($P < 0.05$) stromal cell density was observed in the CAR treatment (Fig. 6C); however, the relationship between follicular morphometry and the surrounding parenchyma cells seemed to be maintained among treatments in a similar way once the nucleus-follicle diameter ratio and stromal cell density were correlated ($P < 0.001$; Fig. 6D). Moreover, the CAR 6h and CAR 12h treatments had a greater ($P < 0.05$) stromal cell density compared to ST-EtOH and PFA 6h; however, the stromal

cell density was similar ($P > 0.05$) between PFA 12h and both CAR treatments (Fig. 6E). Representative images of stromal cell density are shown (Fig. 6F).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to report comparatively the effects of different fixative solutions (ST-EtOH, CAR, and PFA) and exposure times (45 min, 6 h and 12 h) using small equine ovarian tissue fragments (3 x 3 x 1 mm), commonly desired for *in vitro* manipulation techniques. Moreover, the ovaries harvested through ovariectomy from reproductively sound young mares allowed for rich ovarian tissue samples [2] and the evaluation of many preantral follicles. The replacement of the classical fixative solutions by a short-time 70% ethanol fixative (ST-EtOH) preserved the preantral follicle morphometry and stromal cell density similarly compared to the PFA 4% solution, regardless of the exposure time. Nonetheless, the CAR fixative solution in both exposure times had the greatest percentage of normal preantral follicles and the highest stromal cell density among all treatments.

In this study, although the fixation with ST-EtOH solution allowed the characterization of the follicles enclosed in the ovarian tissue, several times, it seemed to be more difficult to evaluate in detail the morphology of the developing preantral follicles category. This observation suggests a potential effect of this fixative solution on structural details (e.g., ooplasm disorganization) of more advanced follicular stages. Notwithstanding, the use of ethanol has been claimed to be an adequate fixative solution for preserving nucleic acids, facilitating, therefore, the RNA isolation for techniques of fixed paraffin-embedded tissue [24–26]. The use of alcohol (ethanol or methanol) alone instantly coagulates proteins but causes considerable distortion of the micro-anatomy in pieces of animal tissue; these unwanted changes are mitigated by diluting the alcohol with chloroform (non-miscible with water), water,

and/or acetic acid (which coagulates chromatin and avoids shrinkage), making the diluted alcohol more compatible with the cellular environment [27]. Moreover, alcohol alone is also suitable for fixing thin-layer preparations such as blood films or cell cultures [27]. A potential explanation for the fact that EtOH 70% solution for up to 45 min before histological processing had similar follicular morphology compared to PFA but lower than Carnoy is the alcohol dehydration properties. Indeed, alcohols are fast fixatives and instantly initiate the tissue dehydration process, which leads to tissue retraction and changes in the appearance of the tissue when compared to those fixed with formalin [26]. Moreover, 70% ethanol used as a fixative solution in ovarian tissue for a long period (12 h and 24 h) has already been shown to cause cytoplasmic retraction and displacement of granulosa cells in bovine preantral follicles [13]. Future studies investigating a gradual replacement in the tissue water content by serial degrees of ethanol, and other chemical combinations, might shed light on the cellular dehydration phenomena and improve the adequate preservation of cellular morphological aspects of the equine ovary.

The mean number of total follicles counted in the fragments was comparable among all treatments in the present study. This finding indicates that all fixative solutions used herein maintained similarly the number of observed follicles in the samples evaluated, therefore not jeopardizing the follicular quantification. However, in general, Carnoy's solution seemed to preserve the morphology of the preantral follicles more efficiently than the other two tested fixatives. Previous reports using Carnoy's fixative demonstrated superior results regarding follicular morphological preservation in several species (equine: [6]; bovine: [13]; and ovine: [28]) using *in vitro* culture-sized fragments (3 x 3 x 1 mm; [13]) or slightly greater-size fragments (5 x 5 x 1 mm; [6]). In agreement with our results, a previous study [29] has shown that Carnoy's solution, which contains alcohol in its composition, has increased eosinophilic staining and promoted a better visualization and contrast of the follicular structures, cells, and

extracellular matrix in ovarian tissue of mice. These findings indicate that Carnoy's solution is preferable when compared with PFA and EtOH fixatives for studies requiring more reliable outcomes concerning the cellular morphology of the equine ovarian tissue.

Interestingly, the follicular and oocyte nuclear diameters varied inversely in Carnoy's compared to ST-EtOH and PFA solutions. Nevertheless, the mean follicular diameters observed in all treatments in our study are like those in previous reports on the equine species [5,8,30,31]. The most reasonable explanation for these variations in the follicle-oocyte measurements between fixatives might have been related to the fact that the Carnoy's solution used in this study did not contain water in its composition. In this regard, Carnoy's solution better stabilizes proteins and DNA in fixed tissue samples [27], dehydrating the tissue in a shorter time than the aqueous solutions used in our study (EtOH 70% and PFA 4%). However, this dehydration process might produce slight measurement variations of the cytoplasmic chambers, therefore decreasing the follicular diameter, as observed in our study. Future studies evaluating cellular organelles using transmission electron microscopy in follicles enclosed in ovarian tissue fixed with Carnoy's solution are warranted.

The use of PFA 4% has been claimed to alter cell morphology with the formation of bubbles and vacuoles in the plasma membrane [28,32,33]. These unwanted changes may explain the greater percentage of abnormal follicles observed in our study in the PFA treatment compared with the Carnoy's fixative. Indeed, a recent study [28] reported greater difficulty in evaluating the morphology of sheep preantral follicles enclosed in ovarian fragments when PFA 4% was used; therefore, this fixative is not recommended for this species. Nevertheless, PFA 4% has commonly been used for equine ovarian tissue under different fixation times (short-time: 1–4 h [31,34]; long-time: 12 h [22]) for evaluation focused mainly on morphological aspects and immunohistochemical analyses. Nevertheless, in the present study, the PFA 4% fixative preserved the preantral follicle normal morphology above 70% regardless of the exposure time.

Therefore, PFA 4% is a reasonable fixative for the morphological evaluation of equine ovarian tissue. In addition, the former fixative offers the advantage of being suitable for immunohistochemistry techniques, reducing the cost and labor time since Carnoy's solution is not recommended as a fixative for immunohistochemical samples. In this regard, in the present study, the three fixatives were solely compared, considering the number and morphology of preantral follicles and the density of stromal cells. Therefore, no definitive conclusions can be drawn regarding their suitability to downstream applications such as IHC techniques.

Regarding parenchymal supportive cells, in the present study, fragments treated with Carnoy's solution had a higher stromal cell density potentially associated with the fixative chemical composition and shorter time used to fix the samples [27], possibly causing a slight tissue retraction. This assumption is corroborated by one of our previous studies [35], suggesting that due to the smaller ovarian surface area, small fragments can shrink before penetration of the cryoprotective agents, therefore reducing the cortical parenchyma and consequently increasing the stromal cell density. In a corresponding manner, larger ovarian tissues showed no alteration in the cortical parenchyma and stromal cell density, suggesting a slower penetration rate with less ovarian tissue retraction. Moreover, a high correlation between the stromal cell density and oocyte nucleus-follicle diameter ratio in the present study indicated that the greater the stromal cell density in the ovarian tissue, the greater the oocyte nucleus-follicle diameter ratio. This finding might be explained by the fact that the fixatives induced expected ovarian tissue dehydration. Therefore, we hypothesized that an increased stromal cell density and reduced distance between the cells might have led to a protective barrier to the preantral follicles and, consequently, allowed a better overall preservation of the tissue quality post-fixation, particularly in the Carnoy's treatment.

5. Conclusions

In conclusion, the present study demonstrated for the first time that using Carnoy's solution, regardless of fixation time, was advantageous to preserve equine ovarian tissue compared to the ST-EtOH and PFA concerning the number and morphology of preantral follicles and the density of stromal cells. The use of ST-EtOH preserved the morphology of preantral follicles similarly to the PFA 4% fixative solution. Notwithstanding, using ethanol 70% solution for a short time of exposure (45 min) proved to be a good alternative to fix equine ovarian tissue when a quick histological evaluation is required for small samples prior to more complicated, time-consuming, and expensive techniques. However, more studies are required to further understand the effects of different fixative solutions on the morphological ultrastructure of different cellular populations and their compatibility with IHC and molecular techniques in equine ovarian tissue.

CRedit authorship contribution statement

The main experimental conception and design were created by M.A.B., B.R.C., G.D.A.G., A.S.V.J., F.L.N.A., and E.L.G. All laboratory procedures were carried out by M.A.B., B.R.C., L.G., A.S.V.J., C.D.C., and C.E.W.N. Contributed reagents / materials / analysis tools: B.R.C., A.S.V.J., C.D.C., and C.E.W.N. Data collection, statistical analyses, and interpretation were performed by M.A.B., B.R.C., G.D.A.G., L.G., A.S.V.J., F.L.N.A., and E.L.G. Manuscript writing and proofreading: M.A.B., B.R.C., G.D.A.G., F.L.N.A., and E.L.G. All authors have read and approved the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Acknowledgments

The authors thank Melba O. Gastal for assisting with figure preparation. This research was supported by grants from the Brazilian Criollo Horse Breeder Association (ABCCC) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; grant no. 21/2551-0002239-6). A.S. Varela Junior, C.D. Corcini, and B.R. Curcio had research productivity fellowships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). M.A. Borges and L. Gheno received DS and MS scholarships, respectively, from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil.

Figure legends

Fig. 1. The heterogeneity pattern of the total number of equine preantral follicles counted per treatment within each replicate (A) and per replicate within each treatment (B) are indicated by dots using different colors, as shown in the legends. The different fixative treatments (ST-EtOH = short-time ethanol, CAR = Carnoy's solution, PFA = paraformaldehyde) and periods of fixation (6 h, 12 h) used are depicted. Each replicate represents an animal with the following ages: Animal 1: 2 years; Animals 2, 3, 4: 2.5 years; Animal 5: 8 years; and Animal 6: 2 years.

Fig. 2. Mean ($\pm$ SEM) number of morphologically (A) normal and (B) abnormal equine preantral follicles [primordial, developing (transitional, primary, and secondary), and overall

(primordial and developing follicles combined)] within the different fixative treatments (ST-EtOH = short-time ethanol; CAR = Carnoy's solution; PFA = paraformaldehyde) and periods of fixation (6 h, 12 h). ^{a,b} Within each morphology class, columns without a common superscript differed ($P < 0.05$) or tended ($P = 0.06$) to differ using Kruskal–Wallis One-Way ANOVA followed by Dunn's test. NS, non-significant.

Fig. 3. (A) Mean ($\pm$ SEM) percentage of morphologically normal equine preantral follicles [primordial, developing (transitional, primary, and secondary), and overall (primordial and developing follicles combined)] exposed to the different fixatives (ST-EtOH = short-time ethanol, CAR = Carnoy's solution, PFA = paraformaldehyde), and periods of fixation (6 h, 12 h). ^{a,b} Within each follicular class and overall, columns without a common superscript differed using Kruskal–Wallis One-Way ANOVA followed by Dunn's test ($P < 0.05$). (B) Illustrative images of equine preantral follicles enclosed in ovarian fragments fixed with Carnoy's solution. (i–iv) Normal and (v–viii) abnormal follicles. (i, v) Primordial, (ii, vi) transitional, (iii, vii) primary, and (iv, viii) secondary follicles. The arrow indicates a transitional follicle. Scale bar = 20 μ m.

Fig. 4. Boxplot charts comparing (A, B) oocyte nuclear and (C, D) follicular diameters (μ m) of (A, C) primordial and (B, D) developing preantral follicles using different fixative solutions (ST-EtOH, short-time ethanol; CAR, Carnoy's solution; PFA, paraformaldehyde), and periods of fixation (6 h and 12 h). The mean ($\pm$ SEM) and range of values of each treatment are presented below each boxplot. ^{a,b} Within the oocyte nuclear diameter and follicular diameter figures, boxplots and means without a common superscript differed ($P < 0.05$) using One-Way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 5. Boxplot charts comparing the oocyte nucleus-follicle diameter ratio of (A) primordial and (B) developing preantral follicles. ^{a,b} Boxplots without a common superscript differed ($P < 0.05$) using One-Way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 6. (A) Mean ($\pm$ SEM) of follicular density [normal and abnormal follicles combined per area (cm^2)] in fragments of equine ovarian tissue exposed to different fixatives (ST-EtOH, short-time ethanol; CAR, Carnoy's solution, PFA, paraformaldehyde), regardless of fixation time. (B) Illustrative images of preantral follicular density are shown; (i, iv) ST-EtOH, (ii, v) CAR, and (iii, vi) PFA. (C) Mean ($\pm$ SEM) stromal cell density per area in ovarian tissue fragments exposed to different fixatives regardless of fixation time. (D) Scatterplot correlation between stromal cell density with nucleus-follicle diameter ratio among fixative solutions considering primordial and developing follicles ($r = 0.34$; $P < 0.001$). (E) Mean ($\pm$ SEM) of stromal cell density per area ($2500 \mu\text{m}^2$) in fragments of ovarian tissue exposed to different fixatives and fixation times (6 h, 12 h). (F) Illustrative images of (vii) low stromal cell density in the ST-EtOH treatment and (viii) high stromal cell density in the CAR 6h treatment. ^{a,b} Means without a common superscript differed ($P < 0.05$) using Kruskal–Wallis's test. (i–iii) 200 x, scale bar = 100 μm ; (iv–vi, vii and viii) 400 x, scale bar = 50 μm .

References

- [1] Aguiar FLN, Gastal GDA, Alves KA, Alves BG, Figueiredo JR, Gastal EL. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. *Theriogenology* 2020;156:296–309.
- [2] Gastal EL, Aguiar FLN, Gastal GDA, Alves KA, Alves BG, Figueiredo JR. Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral follicles: A review. *Theriogenology* 2020;156:283–95.
- [3] Adeniran BV, Bjarkadottir BD, Appeltant R, Lane S, Williams SA. Improved preservation of ovarian tissue morphology that is compatible with antigen detection using a fixative mixture of formalin and acetic acid. *Hum Reprod* 2021;36:1871–90.
- [4] Benammar A, Derisoud E, Vialard F, Palmer E, Ayoubi JM, Poulain M, et al. The mare: A pertinent model for human assisted reproductive technologies? *Animals* 2021;11:2304.
- [5] Alves KA, Alves BG, Rocha CD, Visonná M, Mohallem RFF, Gastal MO, et al. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology* 2015;83:1048–55.
- [6] Búfalo I, González SM, da Silva CB, Lindquist AG, Bergamo LZ, Costa CB, et al. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. *Semin Cienc Agrar* 2016;37:243–50.
- [7] Aguiar FLN, Lunardi FO, Lima LF, Rocha RMP, Bruno JB, Magalhães-Padilha DM, et al. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. *Theriogenology* 2016;85:1106–12.
- [8] Aguiar FLN, Lunardi FO, Lima LF, Rocha RMP, Bruno JB, Magalhães-Padilha DM, et al. Insulin improves in vitro survival of equine preantral follicles enclosed in ovarian tissue and reduces reactive oxygen species production after culture. *Theriogenology* 2016;85:1063–9.
- [9] Aguiar FLN, Gastal GDA, Ishak GM, Gastal MO, Teixeira DIA, Feugang JM, et al. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. *Theriogenology* 2017;99:124–33.
- [10] Bhat AH, Hussein S. Fixation and different types of fixatives: Their role and functions: A review. *Int J Clin Diagn Pathol* 2021;4:113–9.
- [11] Hobro AJ, Smith NI. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vib Spectrosc* 2017;91:31–45.
- [12] Gillespie JW, Best CJM, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, et al. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am J Pathol* 2002;160:449–57.
- [13] Santos JT, Silva-Santos KC, Andrade ER, Lisboa LA, Schneider CL, Ciquini A, et al. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of bovine preantral ovarian follicles. *Semin Cienc Agrar* 2012;33:297–304.

- [14] Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet J* 1983;15:371–2.
- [15] Loesch DA, Rodgers DH. Surgical approaches to ovariectomy in mares. *Compendium* 2003;25:862–9.
- [16] Alves BG, Alves KA, Gastal GDA, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. Spatial distribution of preantral follicles in the equine ovary. *PloS One* 2018;13:e0198108.
- [17] Gomes RG, Andrade ER, Lisboa LA, Ciquini A, Barreiros TRR, Fonseca NAN, et al. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology* 2012;78:731–6.
- [18] Alves KA, Alves BG, Gastal GDA, Tarso SGS, Gastal MO, Figueiredo JR, et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. *PLoS One* 2016;11:e0149693.
- [19] Maciel GAR, Baracat EC, Benda JOA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5321–7.
- [20] Hulshof SC, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Van Den Hurk R. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. *Vet Q* 1994;16:78–80.
- [21] Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winslon RML, Franks S, et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Hum Reprod* 1999;14:1555–62.
- [22] Aguiar FLN, Lunardi FO, Lima LF, Bruno JB, Alves BG, Magalhães-Padilha DM, et al. Role of EGF on in situ culture of equine preantral follicles and metabolomics profile. *Res Vet Sci* 2017;115:155–64.
- [23] Commin L, Buff S, Rosset E, Galet C, Allard A, Bruyere P, et al. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:461–71.
- [24] Giannella C, Zito FA, Colonna F, Paradiso A, Marzullo F, Alaibac M, et al. Comparison of formalin, ethanol, and histochoice fixation on the PCR amplification from paraffin-embedded breast cancer tissue. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:633–5.
- [25] Cox ML, Schray CL, Luster CN, Stewart ZS, Korytko PJ, Khan KNM, et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp Mol Pathol* 2006;80:183–91.
- [26] Buesa RJ. Histology without formalin? *Ann Diagn Pathol* 2008;12:387–96.
- [27] Nowacek JM, Kiernan JA. Fixation and Tissue Processing, in: *Pathology Education Guide: Special Stains and H & E*, Dako North America, California, North America, pp. 141–52, 2010.
- [28] Brito DCC, Ñaupas LVS, Souza SS, Alcântara GLH, Figueiredo JR, Santos RR, et al. Interference of fixatives and fixation period on the morphologic analysis of ovarian preantral follicles. *Zygote* 2022;30:144–7.

- [29] Rowley JE, Rubenstein GE, Manuel SL, Johnson NL, Surgnier J, Kapitsinou PP, et al. Tissue-specific fixation methods are required for optimal in situ visualization of hyaluronan in the ovary, kidney, and liver. *J Histochem Cytochem* 2020;68:75–91.
- [30] Haag KT, Magalhaes-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, et al. Equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method: histological evaluation and validation of a mechanical isolation technique. *Theriogenology* 2013;79:735–43.
- [31] Gastal GDA, Aguiar FLN, Ishak GM, Cavinder CA, Willard ST, Ryan PL, et al. Effect of cryopreservation techniques on proliferation and apoptosis of cultured equine ovarian tissue. *Theriogenology* 2019;126:88–94.
- [32] Melan MA. Overview of Cell Fixation and Permeabilization, in: Javois LC, (Eds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Humana Press. pp. 55–66, 1994.
- [33] Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, Helm MS, Sarkar D, Saleeb RS, et al. Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *EMBO J* 2018;37:139–59.
- [34] Gastal GDA, Aguiar FLN, Alves BG, Alves KA, Tarso SGS, Ishak GM, et al. Equine ovarian tissue viability after cryopreservation and in vitro culture. *Theriogenology* 2017;97:139–47.
- [35] Gastal GDA, Alves BG, Alves KA, Souza MEM, Vieira AD, Varela AS, et al. Ovarian fragment sizes affect viability and morphology of preantral follicles during storage at 4°C. *Reproduction* 2017;153:577–87.
- [36] Nagamine N, Nambo Y, Nagata SI, Nagaoka K, Tsunoda N, Taniyama H, et al. Inhibin secretion in the mare: Localization of inhibin α , β A, and β B subunits in the ovary. *Biol Reprod* 1998;59:1392–8.
- [37] Szlachta M, Tischner M. Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. *Havemeyer Found Monogr Ser* 2002;5:33–5.
- [38] Haag KT, Magalhães-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, et al. In vitro culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology* 2013;79:911–7.
- [39] Gomes RG, Lisboa LA, Silva CB, Max MC, Marino PC, Oliveira RL, et al. Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation. *Theriogenology* 2015;84:750–5.
- [40] Leonel EC, Bento-Silva V, Silva E, Zúccari C. Follicle populations in mare ovaries: from preantral to preovulatory follicles. *Enciclopédia Biosfera* 11, 2015. http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_162.
- [41] Scarlet D, Walter I, Hlavaty J, Aurich C. Expression and immunolocalization of follicle-stimulating hormone receptors in gonads of newborn and adult female horses. *Reprod Fertil Dev* 2015;28:1340–8.

- [42] Alves KA, Alves BG, Gastal GDA, Haag KT, Gastal MO, Figueiredo JR, et al. Preantral follicle density in ovarian biopsy fragments and effects of mare age. *Reprod Fertil Dev* 2017;29:867–75.
- [43] Gastal GDA, Alves BG, Alves KA, Paiva SO, Tarso SGS, Ishak GM, et al. Effects of cryoprotectant agents on equine ovarian biopsy fragments in preparation for cryopreservation. *J Equine Vet Sci* 2017;53:86–93.
- [44] Gonzalez SM, da Silva CB, Lindquist AG, Bufalo I, Morotti F, Lisboa LA, et al. Regional distribution and integrity of equine ovarian pre-antral follicles. *Reprod Domest Anim* 2017;52:836–41.
- [45] Max MC, Silva CB, González SM, Lindquist AG, Búfalo I, Gomes RG, et al. The development and integrity of equine pre-antral follicles cultured in vitro with follicle-stimulating hormone (FSH) supplementation. *Reprod Domest Anim* 2017;52:899–904.
- [46] Gomes RG, Silva CB, González SM, Oliveira RL, Max MC, Lisboa LA, et al. Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine preantral follicles in short-term culture. *Theriogenology* 2018;105:169–73.
- [47] Ishak GM, Bashir ST, Dutra GA, Gastal GDA, Gastal MO, Cavinder CA, et al. In vivo antral follicle wall biopsy: a new research technique to study ovarian function at the cellular and molecular levels. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16:1–12.
- [48] Max MC, Bizarro-Silva C, Búfalo I, González SM, Lindquist AG, Gomes RG, et al. In vitro culture supplementation of EGF for improving the survival of equine preantral follicles. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim* 2018;54:687–91.
- [49] Ishak GM, Dutra GA, Gastal GD, Gastal MO, Feugang JM, Gastal EL. Transition to the ovulatory season in mares: An investigation of antral follicle receptor gene expression in vivo. *Mol Reprod Dev* 2019;86:1832–45.
- [50] Marino PC, Bizarro-Silva C, Búfalo I, Rosa CO, Gonçalves GR, Lisboa LA, et al. Growth and differentiation factor-9 supplementation affects viability and morphology of preantral follicles in equine ovarian fragments during short-term in vitro culture. *Braz Arch Biol Technol* 2019;62:1–9.
- [51] Ishak GM, Dutra GA, Gastal GDA, Elcombe ME, Gastal MO, Park SB, et al. Deficiency in proliferative, angiogenic, and LH receptors in the follicle wall: implications of season toward the anovulatory condition. *Domest Anim Endocrinol* 2020;70:106382.

Table 1

Different types of fixatives, periods of fixation, and tissue size used for histological processing of equine ovarian tissue.

Type of fixative	Period of fixation	Tissue size	Fresh control MNF * (%)	Reference
Paraformaldehyde 4%	24 h	—	—	Nagamine et al., 1998
Formalin 10%	6 weeks	—	—	Szlachta and Tischner, 2002
Bouin	24 h	3 × 3 × 1 mm	77 (98.7%)	Gomes et al., 2012
Bouin	2 h	1.6 × 15 mm	13 (72%)	Haag et al., 2013a
Bouin	2 h	1.6 × 15 mm	—	Haag et al., 2013b
Bouin	24 h	15 × 15 × 1 mm	565 (89%)	Alves et al., 2015
Bouin	24 h	5 × 5 × 1 mm	64 (100%)	Gomes et al., 2015
Carnoy's solution	12 h	3 mm	—	Leonel et al., 2015
Bouin	<48 h	5–10 mm	—	Scarlet et al., 2015
Bouin	2 h	1.6 × 15 mm	1351 (98.0%)	Alves et al., 2016
Paraformaldehyde 4%	12 h	3 × 3 × 1 mm	157 (76.2%)	Aguiar et al., 2016a
Paraformaldehyde 4%	12 h	3 × 3 × 1 mm	107 (64.1%)	Aguiar et al., 2016b
Carnoy's solution / Bouin / Formalin 10%	6/12/24 h	5 × 5 × 1 mm	170 (36.7%)	Búfalo et al., 2016
Bouin	2 h	1.6 × 15 mm	319 (95%)	Alves et al., 2017
Formalin 10%	12 h	1.6 × 15 mm	102 (52%)	Aguiar et al., 2017a
Paraformaldehyde 4%	12 h	3 × 3 × 1 mm	158 (76.3%)	Aguiar et al., 2017b
Paraformaldehyde 4%	4 h	1.5 × 1.5 × 10 mm	23 (95.8%)	Gastal et al., 2017a
Bouin	2 h	1.5 × 1.5 × 10 mm	186 (79.2%)	Gastal et al., 2017b
Paraformaldehyde 4%	1 h	** WO vs. 2 × 2 × 12 mm vs. 0.5 × 1 × 1 mm	189 (86.3%)	Gastal et al., 2017c
Carnoy's solution	12 h	1.5 × 0.5 × 0.5 cm	1059 (93.7%) 901 (96.0%)	Gonzalez et al., 2017 *** Exp. 1 and Exp. 2
Bouin	24 h	3 × 3 × 1 mm	182 (70.8%)	Max et al., 2017
Bouin	24 h	5 × 5 × 1 mm	180 (100%)	Gomes et al., 2018
Bouin	2 h	—	—	Ishak et al., 2018
Bouin	24 h	3 × 3 × 1 mm	232 (64.8%)	Max et al., 2018
Paraformaldehyde 4%	4 h	3 × 3 × 0.5 mm	28 (81.2%)	Gastal et al., 2019
Formalin 10%	4 h	—	—	Ishak et al., 2019
Bouin	24 h	5 × 5 × 1 mm	—	Marino et al., 2019
Formalin 10%	4 h	—	—	Ishak et al., 2020

* MNF, morphologically normal follicles obtained from fresh control group; ** WO, whole ovary; *** Exp., experiment.

Table 2

Preantral follicle density within ovarian fragments from six mares submitted to different fixative solutions and times of exposure.

Treatments	Replicate *	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4	Total per replicate	Overall per treatment **
ST-EtOH	1	15.2 ± 5.6 ^a	10.3 ± 5.6 ^a	10.9 ± 7.2 ^a	27.6 ± 16.5 ^a	16.0 ± 4.9 ^B	49.8 ± 5.5 ^Y
	2	45.2 ± 17.9 ^a	51.1 ± 19.5 ^a	38.7 ± 19.1 ^a	12.5 ± 8.5 ^a	36.9 ± 8.4 ^A	
	3	39.2 ± 7.3 ^{ab}	5.0 ± 3.5 ^b	5.3 ± 2.8 ^b	192.7 ± 39.0 ^a	60.5 ± 16.2 ^{AB}	
	4	205.6 ± 36.2 ^a	131.7 ± 38.3 ^{ab}	202.8 ± 27.6 ^a	34.1 ± 14.7 ^b	143.5 ± 18.8 ^{AB}	
	5	33.1 ± 12.3 ^a	12.0 ± 5.5 ^{ab}	1.8 ± 1.8 ^b	8.8 ± 7.0 ^{ab}	13.9 ± 4.2 ^A	
	6	51.0 ± 16.6 ^a	44.2 ± 9.6 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	15.5 ± 10.3 ^{ab}	27.7 ± 6.3 ^{ABC}	
CAR 6h	1	0.0 ± 0.0 ^b	287.9 ± 51.5 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	72.0 ± 24.4 ^A	58.1 ± 7.2 ^Y
	2	26.6 ± 8.8 ^a	10.0 ± 5.2 ^{ab}	0.0 ± 0.0 ^b	4.2 ± 4.2 ^{ab}	10.2 ± 3.2 ^A	
	3	82.1 ± 11.1 ^{ab}	33.2 ± 22.0 ^b	78.4 ± 18.1 ^{ab}	123.8 ± 21.9 ^a	79.3 ± 10.5 ^A	
	4	149.9 ± 79.7 ^a	149.8 ± 57.7 ^a	141.7 ± 36.7 ^a	185.4 ± 32.9 ^a	156.7 ± 26.5 ^A	
	5	27.4 ± 9.3 ^a	13.3 ± 7.2 ^a	7.3 ± 5.1 ^a	2.5 ± 2.5 ^a	12.6 ± 3.5 ^A	
	6	8.3 ± 5.9 ^a	34.6 ± 16.6 ^a	4.2 ± 4.2 ^a	23.1 ± 7.8 ^a	17.6 ± 5.1 ^C	
CAR 12h	1	0.0 ± 0.0 ^b	66.7 ± 38.7 ^{ab}	132.0 ± 20.7 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	49.7 ± 14.0 ^{AB}	49.7 ± 6.2 ^Y
	2	47.4 ± 12.6 ^a	30.0 ± 13.0 ^{ab}	12.7 ± 4.3 ^{ab}	9.4 ± 9.4 ^b	24.9 ± 5.6 ^A	
	3	65.8 ± 21.2 ^a	55.6 ± 23.5 ^a	90.4 ± 20.4 ^a	38.2 ± 15.0 ^a	62.5 ± 10.2 ^{AB}	
	4	311.8 ± 69.8 ^a	15.1 ± 5.3 ^b	35.1 ± 29.4 ^b	57.7 ± 35.7 ^b	104.9 ± 28.6 ^{BC}	
	5	2.6 ± 2.6 ^b	42.7 ± 15.3 ^{ab}	2.2 ± 2.2 ^b	71.2 ± 25.2 ^a	29.7 ± 8.6 ^A	
	6	68.8 ± 20.5 ^a	4.2 ± 4.2 ^b	26.0 ± 10.4 ^{ab}	3.2 ± 3.2 ^b	24.8 ± 7.1 ^{BC}	
PFA 6h	1	0.0 ± 0.0 ^b	94.4 ± 24.2 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	16.2 ± 5.8 ^{ab}	27.7 ± 8.9 ^B	31.0 ± 3.6 ^Z
	2	17.1 ± 10.6 ^{ab}	61.8 ± 16.1 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	58.1 ± 8.2 ^a	34.2 ± 6.7 ^A	
	3	24.8 ± 9.3 ^{ab}	0.0 ± 0.0 ^b	7.4 ± 7.4 ^b	87.8 ± 10.8 ^a	30.0 ± 7.0 ^{BC}	
	4	0.0 ± 0.0 ^a	9.6 ± 5.6 ^a	28.8 ± 16.6 ^a	—	12.8 ± 6.1 ^D	
	5	10.4 ± 7.4 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	19.5 ± 9.4 ^a	7.5 ± 3.2 ^A	
	6	87.2 ± 37.2 ^{ab}	11.2 ± 6.1 ^b	137.2 ± 22.5 ^a	11.8 ± 6.2 ^b	61.9 ± 13.9 ^{AB}	
PFA 12h	1	17.1 ± 8.0 ^a	9.4 ± 7.7 ^a	8.2 ± 3.3 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	8.7 ± 2.9 ^B	33.7 ± 3.9 ^{YZ}
	2	58.0 ± 25.0 ^a	24.7 ± 9.6 ^a	21.8 ± 14.1 ^a	—	34.8 ± 10.2 ^A	
	3	16.8 ± 5.9 ^a	4.1 ± 2.7 ^a	14.3 ± 5.8 ^a	2.1 ± 2.1 ^a	9.3 ± 2.4 ^C	
	4	24.3 ± 12.7 ^b	120.0 ± 26.2 ^a	122.5 ± 35.6 ^{ab}	49.1 ± 12.4 ^{ab}	79.0 ± 13.5 ^C	
	5	3.5 ± 2.3 ^a	2.2 ± 2.2 ^a	1.8 ± 1.8 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	1.9 ± 0.9 ^A	
	6	54.5 ± 6.5 ^{ab}	19.7 ± 6.0 ^b	101.3 ± 26.3 ^a	100.1 ± 19.2 ^a	68.9 ± 9.9 ^A	

* Within a row, the replicate number within each treatment is indicated. ^{ab} Values with different superscript lowercase letters within each replicate of each treatment differ ($P < 0.05$) among fragments; sample size: $n = 9$ sections/fragment. ^{ABC} Values with different superscript uppercase letters within each replicate differ ($P < 0.05$) among treatments; sample size: $n = 36$ sections/replicate. ** Preantral follicle density considering all replicates per treatment. ^{YZ} Values with different superscript letters differ ($P < 0.05$) among treatments; sample size: $n = 216$ sections per treatment. ST-EtOH = short-time ethanol, CAR = Carnoy's solution, PFA = paraformaldehyde.

Supplementary Table 1

Density of preantral follicles (per cm²) classified as morphologically normal or abnormal, and follicular class (primordial or developing) enclosed in equine ovarian fragments submitted to different fixative solutions.

Fixative solutions	Normal	Abnormal	Primordial	Developing
ST-EtOH	18.7 ± 2.6 ^{bc}	31.1 ± 2.8 ^a	18.9 ± 2.5 ^a	30.8 ± 2.9 ^a
CAR 6h	32.1 ± 2.6 ^a	26.0 ± 2.8 ^{ab}	24.6 ± 2.5 ^a	33.5 ± 2.9 ^a
CAR 12h	25.9 ± 2.6 ^{ab}	23.7 ± 2.8 ^{ab}	19.5 ± 2.5 ^a	29.9 ± 2.9 ^a
PFA 6h	9.8 ± 2.7 ^c	18.9 ± 2.9 ^b	14.9 ± 2.6 ^a	13.7 ± 3.0 ^b
PFA 12h	13.6 ± 2.7 ^c	20.0 ± 2.9 ^b	17.5 ± 2.6 ^a	16.1 ± 3.0 ^b
TOTAL	20.4 ± 1.4	24.3 ± 1.5	19.4 ± 1.3	25.2 ± 1.5

^{ab} Within the column, different superscript lowercase letters differ ($P < 0.05$) among fixative solutions (treatments). Sample size: ST-EtOH, $n = 216$ histological sections; PFA 6h, $n = 207$; PFA 12h, $n = 207$; CAR 6h, $n = 216$; and CAR 12h, $n = 216$. ST-EtOH = short-time ethanol, CAR = Carnoy's solution, PFA = paraformaldehyde.

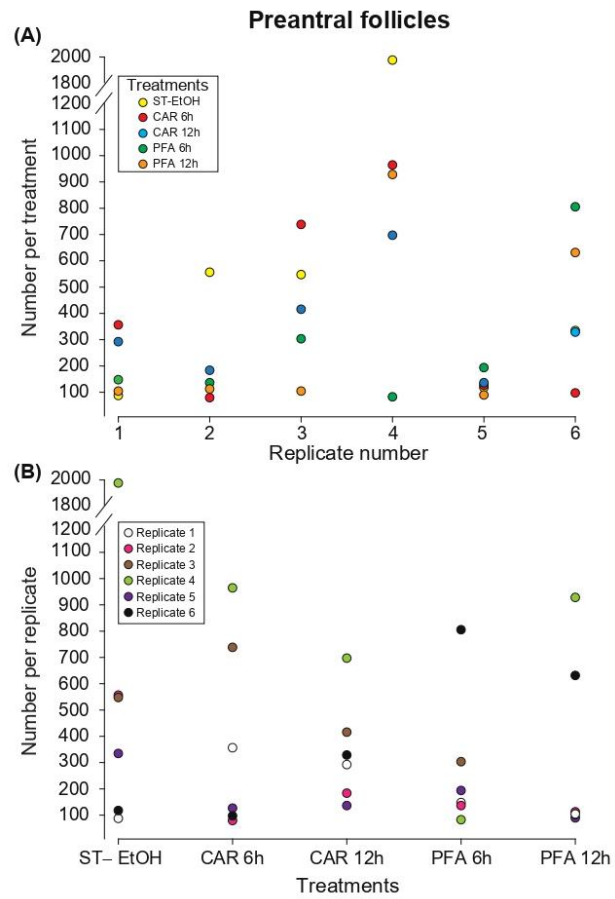


Figure 1

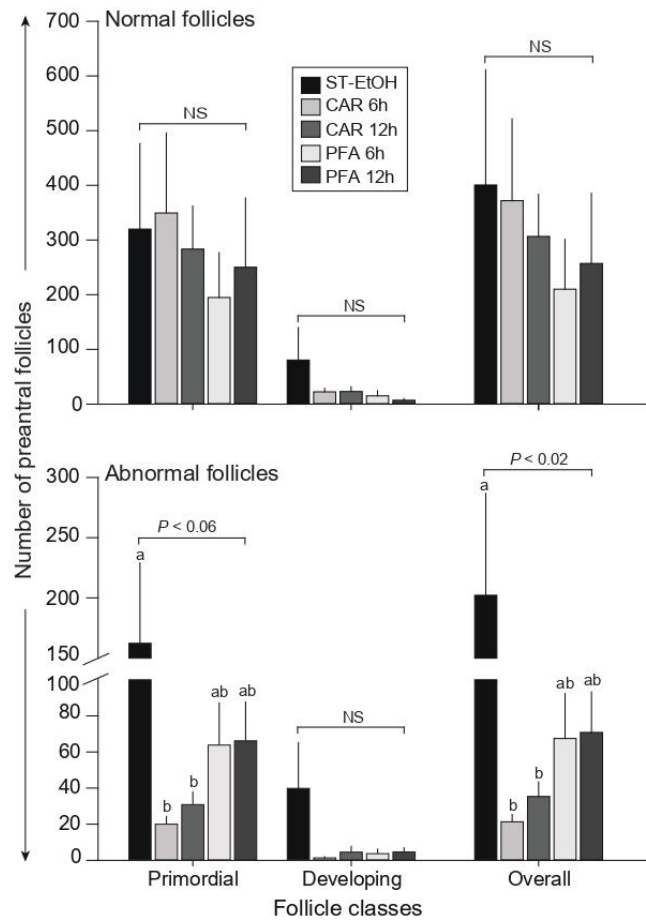


Figure 2

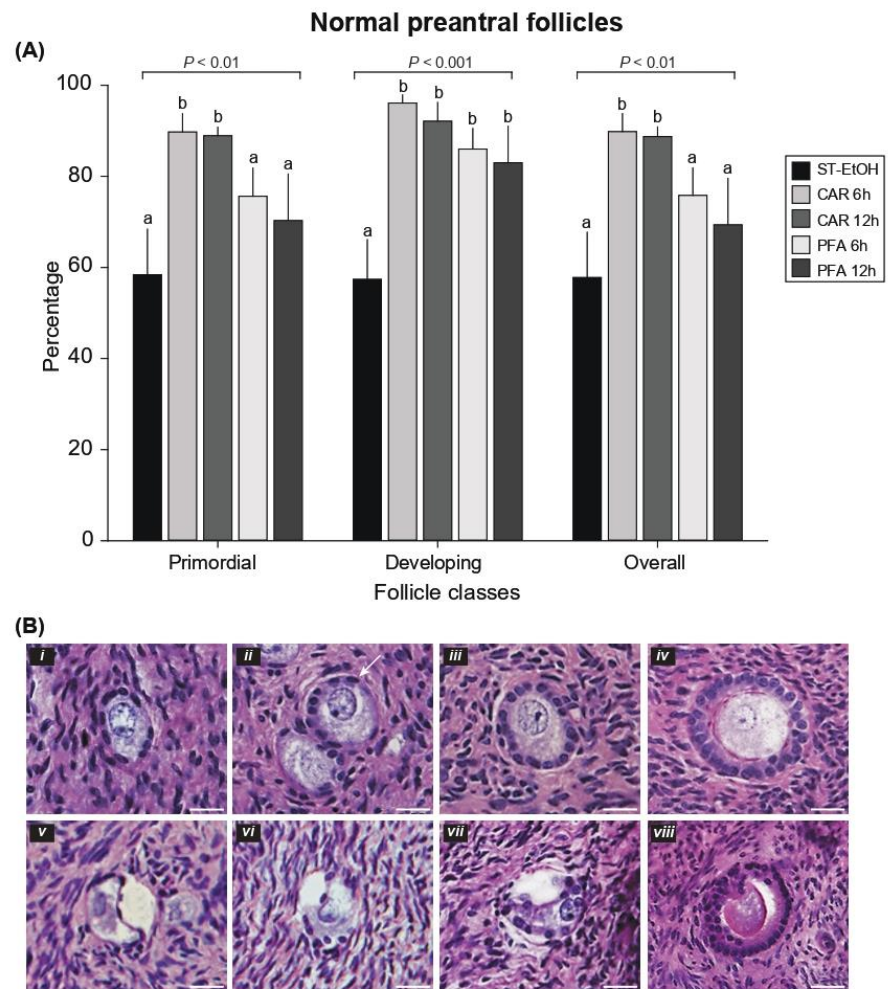


Figure 3

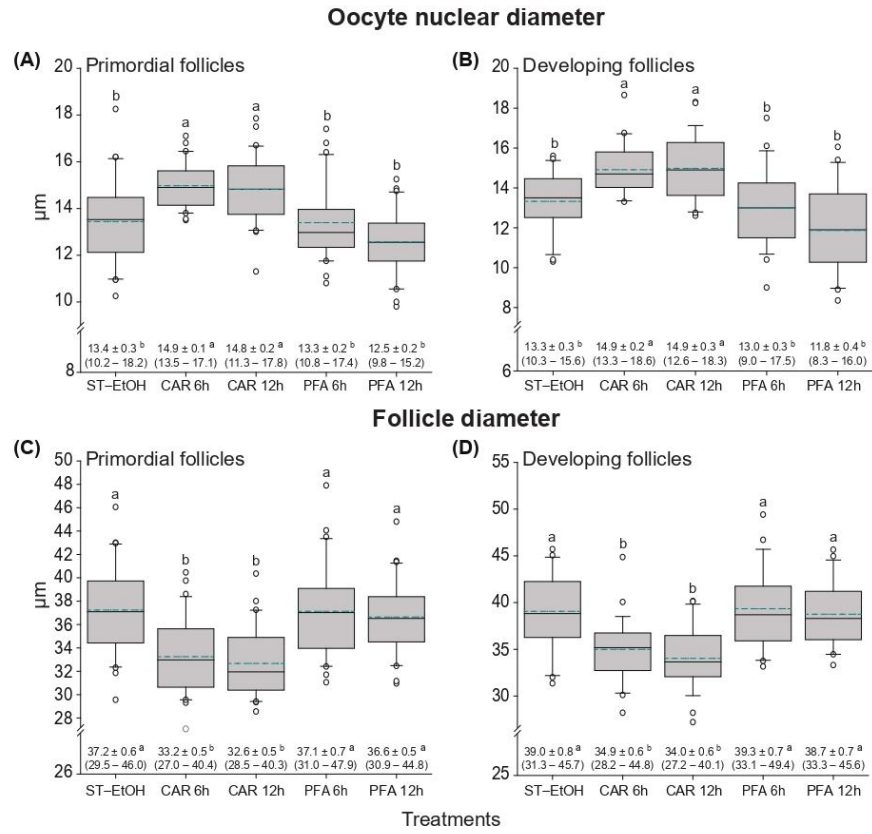


Figure 4

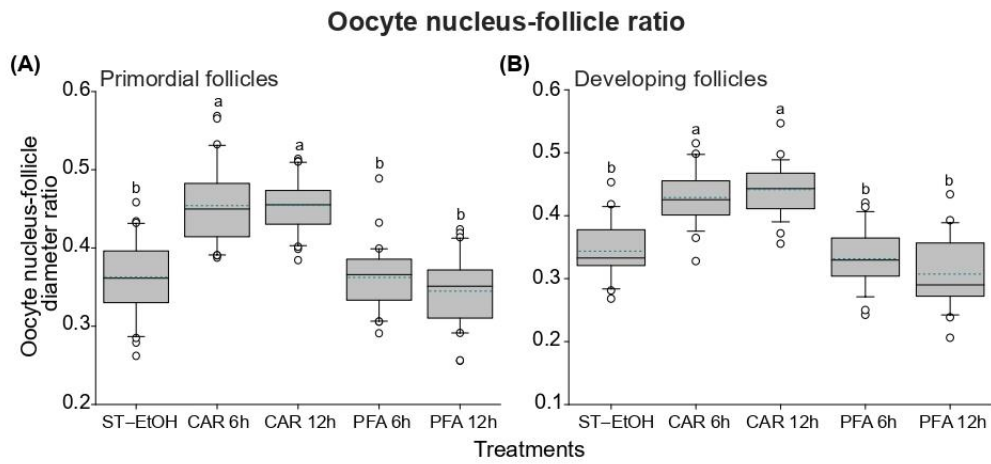


Figure 5

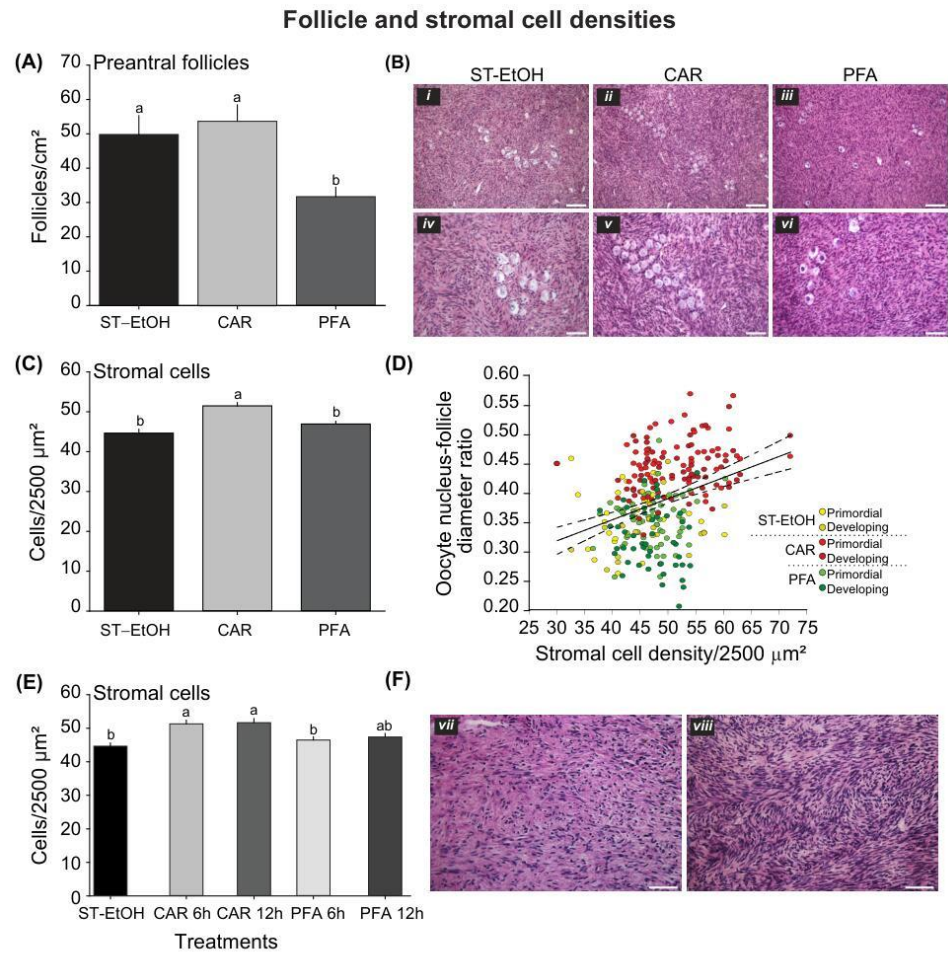


Figure 6

3.2 Artigo 2 – Produto Técnico Tecnológico (Produto bibliográfico de aplicabilidade nacional na popularização da ciência)

Metodologias Ativas no Ensino Superior de Medicina Veterinária: Oficina de Manipulação de Tecido Ovariano Equino.

Morgana A. Borges, Gustavo D.A. Gastal, Francisco L.N. Aguiar, Luiza Gheno, Gabriela C. Silva, Rafaela A. Oliveira, Milena M. Antunes, Bruna R. Curcio

Será submetido à Revista Ensino & Pesquisa

Qualis em Medicina Veterinária: A3

Metodologias Ativas no Ensino Superior de Medicina Veterinária: Oficina de Manipulação de Tecido Ovariano Equino.

Morgana A. Borges, Gustavo D.A. Gastal, Francisco L.N. Aguiar, Luiza Gheno, Gabriela C. Silva, Rafaela A. Oliveira, Milena M. Antunes, Bruna R. Curcio

Resumo

As pesquisas e aplicações de biotecnologias relacionadas à reprodução equina geram alta empregabilidade no setor. Desta forma, é fundamental que o profissional tenha conhecimento prático e teórico em anatomia, fisiologia, manejo e técnicas laboratoriais na área de reprodução equina. Sabendo-se que o processo ensino-aprendizagem vai além da transmissão de informações, a utilização de metodologias ativas no processo pedagógico desempenha um papel fundamental na formação sociocultural e profissional dos estudantes de Medicina Veterinária dentro do contexto das disciplinas do eixo profissionalizante. O objetivo do presente estudo é apresentar a utilização de metodologias ativas no ensino superior de Medicina Veterinária. Assim como avaliar o aprendizado direto dos alunos de graduação envolvidos, com ênfase na compreensão dos processos de manipulação de tecido ovariano equino. Foram utilizadas metodologias ativas como ferramenta de ensino dentro de projetos de pesquisa, com ênfase no envolvimento ativo dos alunos em atividades práticas de execução de protocolos experimentais, orientação direta, condução de seminários, discussão de casos clínicos e artigos científicos. A partir da avaliação realizada após as oficinas, obtivemos uma aceitação positiva de mais de 85% sobre a didática utilizada nas práticas. Estes resultados corroboram o fato que as atividades práticas como experimentos em laboratório, visitas educacionais e recursos audiovisuais, enriquecem a experiência de aprendizado, tornando-a mais envolvente e profunda. Além disso, a metodologia ativa coloca o aluno no centro do processo de aprendizagem, promovendo seu desenvolvimento cognitivo, psicomotor e afetivo. Portanto, concluímos que é importante oferecer um ambiente de ensino que promova a interação e estimule os alunos, aumentando o interesse deles pelo conteúdo e pela aplicação prática dos projetos de pesquisa conduzidos pelo grupo. Na visão dos alunos, a participação nas atividades teórico-práticas propostas proporcionou um ótimo incremento de conhecimento dos tópicos abordados.

Palavras-Chave: Aprendizagem ativa; Didática; Processo ensino-aprendizagem

Abstract

Research and applications of biotechnologies related to equine reproduction generate high employability in the sector. Thus, it is essential for professionals to have practical and theoretical knowledge in the anatomy, physiology, management, and laboratory techniques in the field of equine reproduction. Recognizing that the teaching-learning process goes beyond the mere transmission of information, the use of active methodologies in pedagogical processes plays a crucial role in the sociocultural and professional development of veterinary medicine students within the context of professionalizing disciplines. The objective of the present study is to present the use of active methodologies in higher education in Veterinary Medicine. As well as to evaluate the direct learning of undergraduate students involved, with emphasis on the understanding of equine ovarian tissue manipulation processes. Active methodologies were employed as teaching tools within research projects, with a focus on actively involving students in practical activities, including the execution of experimental protocols, direct guidance, seminar leadership, discussion of clinical cases, and scientific articles. Based on the evaluations conducted after the workshops, we obtained a positive acceptance rate of over 85% regarding the didactics used in practical activities. These results affirm that practical activities such as laboratory experiments, educational visits, and audiovisual resources enrich the learning experience, making it more engaging and profound. Furthermore, active methodology places the student at the center of the learning process, promoting their cognitive, psychomotor, and affective development. Therefore, we conclude that it is important to provide a teaching environment that encourages interaction and stimulates students, increasing their interest in the content and the practical application of research projects conducted by the group. From the students' perspective, participation in the proposed theoretical-practical activities provided a significant increase in knowledge of the topics covered.

Keywords: Active Learning; Didactics; Teaching and learning process.

Introdução

A metodologia ativa é uma abordagem educacional inovadora que coloca o aluno no centro do processo de ensino-aprendizagem, permitindo que ele desempenhe um papel ativo em sua própria formação e desenvolvimento profissional (Diesel et al., 2017). Em outras palavras, essa abordagem enfatiza o envolvimento ativo do estudante em sua própria aprendizagem e capacitação. A introdução de atividades práticas enriquece a abordagem teórica, tornando-a mais atraente para a vivência dos estudantes. Táticas simples, como a incorporação de apresentações audiovisuais, materiais em vídeo, debates, visitas educacionais a locais diversos, como feiras e museus, bem como a promoção de experimentos práticos em ambientes de laboratório, entre outros métodos, contribuem de maneira significativa para tornar o processo de aprendizagem mais acessível e aprofundado em relação ao conteúdo programático (Interaminense, 2019).

Na abordagem ativa de ensino, as variações podem ocorrer sem afetar a dinâmica do processo de ensino e aprendizagem. De Oliveira e De Pavesi (2019) corroboram que esta metodologia fomenta o aluno na formação para explorar plenamente todas as oportunidades de aprendizado, aproveitando sua autonomia para ler, questionar, analisar e, principalmente, agir. Além disso, as práticas desempenham um papel fundamental no fomento da interação e na construção de conceitos científicos, possibilitando, ademais, que os estudantes adquiram habilidades para abordar objetivamente o ambiente que os cerca e desenvolver soluções para problemáticas complexas (Belotti & Faria, 2010). Sob esta perspectiva, é inegável que a educação transcende a mera transmissão de informações, passando a desempenhar um papel crucial na formação sociocultural dos indivíduos, principalmente na formação profissional no ensino superior.

A utilização de métodos pedagógicos ativos, nos quais o estudante desempenha um papel central no processo de aprendizagem, demonstrando um envolvimento ativo e investigativo é preconizado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária do Brasil (CFMV, 2012). Essas abordagens devem resultar em experiências que visam promover o aprimoramento das faculdades cognitivas, psicomotoras e afetivas do aluno, capacitando-o a adquirir as habilidades essenciais para sua formação. No escopo das estratégias de ensino apresentadas no manual, encontram-se práticas como dramatização, estudo de casos, orientação direta, condução de seminários, resolução de problemas e o enfoque no aprendizado baseado em problemas (CFMV, 2012).

A equideocultura brasileira é reconhecida globalmente devido à alta demanda por oportunidades de emprego e à qualidade do seu plantel, bem como pela sua liderança no estudo e aplicação de novas biotécnicas reprodutivas (Camargo et al., 2023). Na espécie equina, a capacidade reprodutiva está intimamente relacionada ao conhecimento aprofundado e o entendimento das práticas de manejo empregadas por médicos veterinários capacitados. Por isso, é indispensável que o médico veterinário atuante na área de reprodução equina tenha conhecimento teórico, aliado ao prático, englobando anatomia, fisiologia, técnicas laboratoriais e medidas de manejo.

Com o crescente avanço das biotécnicas reprodutivas, é possível manipular folículos pré-antrais com o propósito de promover o seu desenvolvimento completo, otimizando o potencial reprodutivo tanto em espécies de animais produção ([bovino] Santos et al., 2012; [Ovino] Fransolet et al., 2014; [Caprino] Zhou; Zhang, 2005; [Equinos] Alves et al., 2017) como em seres humanos (Telfer et al., 2008). Neste contexto, a espécie equina tem demonstrado ser um potencial modelo animal para os estudos comparativos reprodutivo (Benammar et al., 2021), principalmente na manipulação de tecido ovariano (Alves et al., 2017). No entanto, é necessário implementar um protocolo adequado de processamento e manipulação do tecido ovariano, a fim de preservar e manter a qualidade morfológica tanto dos folículos pré-antrais quanto do tecido estromal (Gastal et al., 2020; Aguiar et al., 2020). Desta forma, para viabilizar o transporte do ovário é comum dividir o córtex ovariano ao meio ou em secções menores para produzir pequenos fragmentos (por exemplo, 3 mm × 3 mm × 1 mm) sob condições assépticas. Tal manipulação tem por objetivo facilitar o manuseio do tecido, no qual posteriormente pode ser aplicado em inúmeras finalidades como a criopreservação, cultivo *in vitro*, isolamento folicular, além de tornar mais fácil a perfusão de nutrientes através do tecido (Gastal et al., 2020). Neste contexto, é de suma importância que os integrantes do grupo de pesquisa tenham conhecimento dos protocolos experimentais de manipulação do tecido ovariano, já que a habilidade de realizar a fragmentação de forma eficaz desempenha um papel fundamental nas análises subsequentes.

O objetivo do presente estudo é apresentar a utilização de metodologias ativas no ensino superior de Medicina Veterinária. Assim como avaliar o aprendizado direto dos alunos de graduação envolvidos, com ênfase na compreensão dos processos de manipulação de tecido ovariano equino.

Metodologia

Os encontros foram ministrados por alunos da Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), integrantes do grupo ClinEq (Grupo de Ensino, Pesquisa e Extensão em Medicina de Equinos), sob orientação dos professores orientadores do grupo e docentes do curso de Graduação em Medicina Veterinária da UFPel. As oficinas foram ofertadas no Hospital de Clínicas Veterinária (HCV) da UFPel, alocado no Campus Capão do Leão/Rio Grande do Sul.

O projeto não estava vinculado a componentes curriculares específicos do curso de Graduação em Medicina Veterinária; portanto, os participantes eram alunos que cursavam do 3º ao 9º semestre. As atividades desenvolvidas foram baseadas nos protocolos experimentais utilizados nos projetos realizados pelo grupo de pesquisa, a fim de aliar os estudos teóricos a prática. Dessa forma, incluiu tópicos relacionados aos componentes curriculares Histologia I e II, Anatomia Animal I e II, Fisiologia Animal I e II, Farmacologia, Clínica Médica de Grandes Animais e Fisiopatologia da Reprodução.

Apresentações dos projetos de pesquisa do grupo

Os alunos de Pós-Graduação apresentavam suas linhas de pesquisa com apoio da literatura, demonstrando a construção do referencial teórico dos projetos. Na sequência apresentando os objetivos, hipóteses, e as metodologias construídas para responder essas questões. Por fim, apresentavam os principais resultados encontrados e publicados no formato de resumos em congressos e artigos em periódicos. Além disso, também foram discutidas questões importantes sobre o bem-estar animal, e dos princípios éticos que é exigido na pesquisa científica, para que a pesquisa seja conduzida com o mínimo de sofrimento animal e consequentemente gerando resultados mais fidedignos.

Dinâmicas de fixação de conteúdo teórico

A dinâmica foi realizada após as apresentações teóricas, através de um questionário com brincadeiras lúdicas. Nesta atividade, simulávamos um jogo de perguntas e respostas, para fixar o conteúdo abordado na oficina, o aluno vencedor do jogo escolhia outro colega que se tornaria responsável a trazer um resumo do artigo científico que seria abordado no próximo encontro.

Práticas de fragmentação de tecido ovariano equino

Previamente as oficinas, foi montado um material teórico pelos alunos de pós-graduação desenvolvido com base em artigos científicos de relevância na área de estudo. Os alunos foram instruídos quanto ao protocolo experimental de fragmentação de tecido ovariano, com este material e após utilizavam o mesmo para auxiliá-los nas atividades. As práticas eram realizadas em ambiente controlado, com a orientação a distância de profissionais de outras instituições com experiência na manipulação de tecido ovariano que trabalham em parceria científica com o grupo. Nesta atividade, os participantes simulavam todo o processo realizado em laboratório após a recuperação do ovário. Os alunos tiveram acesso a manipulação de ovários caninos, ovários equinos e rins bovinos. Os rins bovinos eram utilizados quando não estava disponível os próprios ovários, devido à similaridade de textura e consistência ao tecido ovariano. Os alunos desenvolveram atividades simulando as boas práticas de manipulação dos instrumentos cirúrgicos (Bisturi e pinças), assepsia do ovário, fragmentação e coleta de fragmentos de tecido ovariano para a criopreservação (**Figura 1**). A duração das atividades era em média de 1h e 30min, ao final era estipulado um cronograma para o próximo encontro.



Figura 1. Atividade prática de fragmentação de tecido. Alunos utilizando instrumentos cirúrgicos na realização da fragmentação de rim bovino, simulando o tecido ovariano equino.

Práticas de avaliação histológica

Anteriormente as atividades práticas, os alunos passavam por um treinamento que consistia no uso de imagens de folículos pré-antrais obtidas através do nosso banco de imagens, o que permitia que aprendessem a identificar as diferentes classes dos folículos pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário), avaliassem sua morfologia (normal e anormal) e realizassem a contagem total dos folículos presentes nos fragmentos analisados. Além disso, durante a aula expositiva, as quais contavam com a eventual participação remota de professores de outras instituições, eram realizados questionamentos quanto a morfologia e viabilidade dos folículos, estimulando o pensamento crítico e técnico sobre o material. Após, eram realizadas as práticas histológicas com material provenientes de ovários equinos, já utilizados em projetos de pesquisa específicos. Por fim, depois de estudarem todo o processamento histológico, os alunos utilizavam lâminas histológicas com o auxílio de microscópios ópticos para avaliar morfologicamente os folículos pré-antrais inclusos nos fragmentos de tecido ovariano equino.

Atividades para criar seu próprio projeto de pesquisa

Nesta atividade, os alunos foram divididos em grupos e responsáveis por fazer uma busca na literatura de artigos que utilizassem a manipulação de tecido ovariano. O intuito deste exercício era fazer com que o aluno visualizasse as metodologias discutidas durante as oficinas em um artigo científico, instigando-os a elaborar objetivos e hipóteses para um projeto de pesquisa fictício.

Atividades de fixação de conteúdo teórico sobre função hormonal no ciclo estral da égua

Nesta prática, pontuamos os principais hormônios relacionados no ciclo estral da égua, como: Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), melatonina, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrógeno, prostaglandina e progesterona. Nesta dinâmica, cada aluno ficou responsável pela apresentação do hormônio de uma forma lúdica, fazendo menção sobre a atuação deste no ciclo estral.

Avaliação de satisfação e qualidade das oficinas

No intuito de realizarmos uma avaliação ao final de todos os encontros, para medir a satisfação e qualidade das metodologias empregues durante as oficinas, foi aplicado um questionário com 10 questões em uma escala de avaliação (Ruim, Bom, Muito Bom, Ótimo), permitindo que o aluno escolhesse o grau que melhor descreveu sua experiência.

Resultados

As oficinas de manipulação de tecido ovariano equino foram realizadas no período que compreende o primeiro semestre de 2022 ao segundo semestre de 2023, totalizando 12 encontros. Durante o tempo em que o projeto estava em andamento, juntamente com os coordenadores, as reuniões regulares abrangeram um total de quinze graduandos do curso de Medicina Veterinária da UFPel e oito pós-graduandos do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel. Além de seis residentes do Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Veterinária. A integração de diferentes perspectivas enriqueceu a experiência de aprendizado e motivou os alunos a continuar com os nossos encontros (**Figura 2**).



Figura 2. Encontros teóricos das oficinas de fragmentação de tecido ovariano equino. Estudantes de graduação e pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, integrantes das oficinas de manipulação de tecido ovariano equino no ano de 2022.

Com a participação ativa dos alunos nas oficinas e o estímulo ao estudo dos projetos de pesquisa, eles demonstraram maior interesse pelas áreas de pesquisa investigadas pelo grupo e consequentemente maior participação nos projetos executados. No que diz respeito a atividade para criar seu próprio projeto de pesquisa, os alunos demonstraram dificuldade em formular os objetivos e hipóteses, o que é totalmente compreensível visto a ausência do hábito de leituras científicas. No entanto, se mostraram entusiasmados em reconhecer as metodologias aplicadas durante as oficinas e empregues nos artigos científicos analisados. Além disso, os estudantes passaram a se sentir mais à vontade para sanar dúvidas com os pós-graduandos, fortalecendo os laços entre os membros do grupo. Este entusiasmo e cooperação entre os integrantes do grupo promovem um ambiente propício para avanços significativos no ensino e nas pesquisas. A busca pelo conhecimento e a colaboração mútua são os pilares que impulsionam nossos estudos em direção a novas descobertas e inovações.

A partir dos resultados obtidos com o nosso questionário (Quadro 1) podemos avaliar o *feedback* dos alunos em relação as metodologias ativas aplicadas durante os encontros. No que

diz respeito ao questionamento sobre o conhecimento prévio dos alunos sobre o tema abordado durante as oficinas, 50% dos participantes avaliaram seu conhecimento como “Ruim”, 43,8% avaliaram como “Bom” e apenas 6,3% como “Muito Bom”. No que tange o conhecimento adquirido após a participação dos alunos as oficinas, 43,8% avaliaram sua aprendizagem como “Ótimo”, 31,3% como ‘Muito bom” e 25% como “Bom”. Em síntese, nossas práticas, aliadas ao conhecimento teórico ampliou a compreensão e conscientização dos alunos sobre as possibilidades da profissão. Além disso, as oficinas ofereceram aos alunos a oportunidade de expandir seus conhecimentos na área da Medicina Veterinária, explorando novas perspectivas, incluindo a utilização do tecido ovariano equino em pesquisas e procedimentos clínicos. Também abordamos temas pertinentes, alinhados com os conteúdos das disciplinas de Histologia I e II, Anatomia Animal I e II, Fisiologia Animal I e II, Farmacologia, Clínica Médica de Grandes Animais e Fisiopatologia da Reprodução do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, promovendo uma integração prática e aprofundada dos conceitos aprendidos nessas disciplinas e enfatizando a transversalidade do projeto.

Quadro 1. Questionário de avaliação aplicado aos discentes do curso de Medicina Veterinária participantes das oficinas de manipulação de tecido ovariano equino.

Questionário	Escala de avaliação (%)				
	Ruim	Bom	Muito bom	Ótimo	Total
1. Como você avalia os ministrantes das oficinas?	-	-	1 (6,7)	14 (93,3)	15
2. Como você classifica a sua participação nas oficinas?	-	-	10 (66,7)	5 (33,3)	15
3. Como você classifica o aprendizado ao longo da participação nas oficinas?	-	1 (6,7)	2 (13,3)	12 (80,0)	15
4. Como você classifica o seu conhecimento ANTES da realização das oficinas?	8 (53,3)	6 (40,0)	1 (6,7)	-	15
5. Como você classifica o seu conhecimento DEPOIS da realização das oficinas?	-	3 (20,0)	5 (33,3)	7 (46,7)	15
6. Como você avalia a didática dos ministrantes durante as práticas de fragmentação de tecido ovarino?	-	1 (6,7)	1 (6,7)	13 (86,7)	15
7. Como você elenca o formato dos encontros?	-	-	4 (26,7)	11 (73,3)	15
8. Como você elenca a forma com que os conhecimentos adquiridos podem contribuir na rotina prática diária como Médico Veterinário?	-	1 (6,7)	3 (20,0)	11 (73,3)	15
9. Como você elenca a forma com que os conhecimentos adquiridos ao longo das oficinas podem contribuir na execução dos protocolos experimentais do grupo de pesquisa?	-	1 (6,7)	3 (20,0)	11 (73,3)	15
10. Como você avalia as metodologias ativas utilizadas nas oficinas?	-	-	4 (26,7)	11 (73,3)	15

Discussão

Através das abordagens utilizadas, foi possível assegurar um trabalho colaborativo entre alunos, professores e profissionais da área de Medicina Veterinária. As metodologias ativas empregadas foram essenciais para o sucesso da oficina de manipulação de tecido ovariano equino. Além disso, é de suma importância que os alunos integrem os projetos de pesquisa idealizados pelo grupo. Uma vez que neste projeto, a avaliação histológica bem-sucedida depende das técnicas de manipulação de tecidual empregue, garantindo a preservação da morfologia do tecido (Gastal et al., 2020; Aguiar et al., 2020). Desta forma, é fundamental que os educadores busquem abordagens pedagógicas inovadoras que coloquem o protagonismo do estudante no centro, estimulando a motivação e fomentando a autonomia.

Nesse contexto, práticas como a promoção da escuta ativa dos estudantes, a valorização de suas perspectivas, o cultivo da empatia, a resposta aos seus questionamentos e o estímulo ao engajamento, entre outras, demonstram ser facilitadoras da motivação (Berbel, 2011) e contribuem para a criação de um ambiente propício à aprendizagem. O resultado positivo das avaliações dos alunos participantes referentes a oficina demonstra que as metodologias foram bem aceitas e aumentaram o envolvimento dos alunos em projetos de pesquisa do grupo, além de potencializar a retenção de conhecimento. A totalidade dos alunos integrantes das oficinas auxiliam em projetos científicos idealizados pelo grupo de pesquisa. Evidenciando o interesse de alunos da graduação em seguir o desenvolvimento profissional dentro da academia, tornando-se um profissional qualificado que busca aperfeiçoar suas habilidades e conhecimentos. De Oliveira e De Pavesi (2019) concluíram em seu estudo que a utilização de metodologias ativas visa capacitar uma geração de pesquisadores moldados em sua independência científica.

Desta forma, a transversalidade do projeto é evidenciada pela capacidade de integrar os diversos tópicos abordados às disciplinas mencionadas, estabelecendo uma rede de conhecimento interdisciplinar que permeia todo o currículo do curso de Medicina Veterinária. As metodologias ativas e a interdisciplinaridade são fundamentais para uma formação educacional mais crítica, capaz de superar a visão fragmentada do conhecimento, do currículo e da prática pedagógica, promovendo assim uma abordagem mais integrada e diversificada no processo de ensino e aprendizagem (Brisolla, 2020). Além disso, através da interconexão entre os assuntos como Histologia, Anatomia, Fisiologia, Farmacologia, Clínica Médica de Grandes Animais e Fisiopatologia da Reprodução, os discentes são instigados a não apenas assimilar os

conceitos isolados de cada disciplina, mas também a compreender sua correlação. Por exemplo, ao explorar a manipulação de tecido ovariano equino, os estudantes não apenas investigam aspectos histológicos específicos, mas também estabelecem correlações com a anatomia e fisiologia do sistema reprodutivo pertinentes à prática clínica. Essa abordagem transversal não apenas enriquece a compreensão dos alunos sobre os temas abordados, mas também os prepara para uma prática veterinária mais integrada, na qual a colaboração entre diversas áreas do conhecimento é essencial para o sucesso profissional.

As orientações do CFMV (2012) abordam estratégias de ensino-aprendizagem voltadas para o desenvolvimento das competências humanísticas na formação de médicos veterinários. O documento propõe abordagens pedagógicas que visam não apenas o conhecimento técnico-científico, mas também aspectos humanos, éticos e sociais. Tendo como objetivo formar profissionais mais capacitados não apenas em suas habilidades técnicas, mas também em sua capacidade de lidar com questões éticas, sociais e de relacionamento interpessoal, contribuindo para um mundo melhor. Como orientadores e docentes, temos a capacidade e a responsabilidade de empregar a didática como uma ferramenta que torna mais fácil o processo de ensino-aprendizagem, desde que se utilize técnicas de ensino que inspirem e auxiliem na construção do conhecimento (Do Espírito Santo & Da Luz, 2013). A avaliação das Diretrizes Curriculares Nacionais (DCN) nos cursos da área da saúde sustenta essa concepção, destacando a importância de um ensino que promova a reflexão crítica e a adoção de metodologias que incentivem os alunos a refletirem sobre a realidade social e a desenvolverem habilidades de aprendizado, conforme estabelecido pelo Brasil (2001).

Em nossas oficinas, a inclusão de metodologias ativas com abordagens didáticas para o ensino de protocolos experimentais foi amplamente aceita pelo discente e com resultados positivos no que diz respeito à compreensão do tema. Aliás, A promoção das oficinas motivou os alunos a se envolverem de forma mais ativa nos projetos científicos, manifestando um interesse crescente pelas atividades atualmente em desenvolvimento no grupo e oferecendo auxílio valioso aos pós-graduandos em suas pesquisas. Culminando com a iniciativa da redação científica de resumos para congressos de iniciação científica de 90% dos alunos de graduação envolvidos nessas atividades.

Considerações Finais

Através das abordagens didáticas utilizadas durante nossos encontros, foi possível reforçar a importância das metodologias ativas no processo de aprendizado, encorajando a autonomia dos estudantes e o desenvolvimento de habilidades práticas. Além disso, os alunos de graduação em medicina veterinária foram instigados a estimular o pensamento crítico e a resolução de problemas por meio da análise e discussão de casos e situações reais relacionados à manipulação de tecido ovariano equino. Na visão dos alunos, a participação nas atividades teórico-práticas propostas proporcionou um ótimo incremento de conhecimento dos tópicos abordados.

Agradecimentos

Agradecimento à Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária e ao Hospital de Clínicas Veterinárias. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Contribuição de cada autor

Os autores M.A.B. e L.G. escreveram o texto final; G.C.S., R.A.O e M.M.A contribuíram com coleta e análises dos dados do questionário; M.A.B. e B.R.C. planejaram o projeto, e B.R.C. atuou como coordenador, orientador dos discentes da graduação e pós-graduação e na redação do manuscrito.

Referências bibliográficas

AGUIAR, F. L. N. et al. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 296-309, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.043>. Acesso em: 06 set. 2024

ALVES, K. A. et al. Preantral follicle density in ovarian biopsy fragments and effects of mare age. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 5, p. 867-875, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD15402>. Acesso em: 06 set. 2024

BELOTTI, Salua Helena Abdalla; FARIA, Moacir Alves de. Relação professor/aluno. **Saberes da Educação**, v. 1, n. 1, p. 01-12, 2010. Disponível em: <https://docs.uninove.br/arte/fac/publicacoes/pdfs/salua.pdf>. Acesso em: 07 set. 2024

BENAMMAR, Achraf et al. The mare: a pertinent model for human assisted reproductive technologies?. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2304, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani11082304>. Acesso em: 06 set. 2024

BERBEL, Neusi Aparecida Navas. As metodologias ativas e a promoção da autonomia de estudantes. **Semina: Ciências sociais e humanas**, v. 32, n. 1, p. 25-40, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0383.2011v32n1p25>. Acesso em: 07 set. 2024

BRASIL. MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. Institui Diretrizes Curriculares Nacionais do Curso de Graduação em Enfermagem [Internet]. 2001. Disponível em: https://normativasconselhos.mec.gov.br/normativa/view/CNE_CES03.pdf?query=Curr%C3%ADculos. Acesso em: 07 set. 2024

BRISOLLA, Livia. A prática pedagógica no ensino superior: planejamento, interdisciplinaridade e metodologias ativas. **Devir educação**, v. 4, n. 1, p. 77-92, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.30905/ded.v4i1.157>. Acesso em: 07 set. 2024

CAMARGO, Carlos Eduardo; SEGUI, Márcio Saporski; KOZICKI, Luiz Ernandes. Reprodução equina: um modelo de ensino. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 2, p. 231-233, 2023. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v47/n2/RB%201071%20Camargo>

[%20p.231-233.pdf](#). Acesso em: 08 set. 2024

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). (2012). Estratégias de ensino-aprendizagem para desenvolvimento das competências humanísticas: propostas para formar médicos veterinários para um mundo melhor. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/estrategias-de-ensino-aprendizagem-para-desenvolvimento-das-competencias-humanisticas/comunicacao/publicacoes/2020/08/03/#4> Acesso em: 08 set. 2024

DE OLIVEIRA, Gustavo Duarte; DE PAVESI FARIA, Vanessa. Metodologia ativa na educação em medicina veterinária. **Pubvet**, v. 13, p. 166, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n5a335.1-7>. Acesso em: 07 set. 2024

DIESEL, Aline; BALDEZ, Alda Leila Santos; MARTINS, Silvana Neumann. Os princípios das metodologias ativas de ensino: uma abordagem teórica. **Revista Thema**, v. 14, n. 1, p. 268-288, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.15536/thema.14.2017.268-288.404> Acesso em: 07 set. 2024

DO ESPÍRITO SANTO, Eniel; DA LUZ, Luiz Carlos Sacramento. Didática no ensino superior: perspectivas e desafios. **Saberes: Revista interdisciplinar de Filosofia e Educação**, n. 8, 2013. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/saberes/article/view/2201>. Acesso em: 8 set. 2024.

DOS SANTOS, Joabel Tonellotto et al. Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais ovarianos bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 297-303, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p297>. Acesso em: 07 set. 2024

FRANSOLET, Maïté et al. Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91073, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091073> Acesso em: 07 set. 2024

GASTAL, E. L. et al. Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral follicles: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 283-295, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.044> Acesso em: 07 set. 2024

INTERAMINENSE, Bruna de Kássia Santana. A Importância das aulas práticas no ensino da Biologia: Uma Metodologia Interativa/The Importance of practical lessons in the teaching of Biology: An Interactive Methodology. ID on line. **Revista de psicologia**, v. 13, n. 45, p. 342-354, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/online.v13i45.1842>. Acesso em: 07 set. 2024

TELFER, Evelyn E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1151-1158, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/den070>. Acesso em: 08 set. 2024

ZHOU, Huanmin; ZHANG, Yong. Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, n. 3, p. 235-242, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.09.004>. Acesso em: 08 set. 2024.

4 Considerações Finais

Considerando os trabalhos realizados neste projeto, podemos observar que tanto o estudo científico sobre a avaliação de diferentes fixadores sob a preservação morfológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano, quanto a abordagem didática adotada nas oficinas com os estudantes de Medicina Veterinária promoveram avanços no conhecimento científico e educacional importantes para a melhora das biotécnicas reprodutivas em equinos.

Nossos resultados evidenciaram a eficácia da solução fixadora Carnoy para preservar fragmentos de tecido ovariano, independentemente do tempo de exposição em relação a outras soluções comumente utilizadas. Contudo, constatamos que o paraformaldeído 4% manteve a morfologia normal dos folículos pré-antrais em mais de 70%, além disso, a utilização desta solução fixadora é indicada para estudos morfológicos que posteriormente aplicarão técnicas de imunohistoquímica. Todavia, a solução de etanol a 70% por um curto período de exposição (45 minutos) demonstrou ser uma alternativa vantajosa, para a fixação rápida de tecido ovariano equino, quando necessário uma avaliação histológica imediata. Como perspectivas do presente estudo, apontamos a necessidade de análises adicionais para a compreensão dos efeitos das diferentes soluções fixadoras na ultraestrutura celular e tecidual, além do efeito sobre proteínas marcadoras específicas da qualidade do tecido ovariano. Adicionalmente, vislumbramos a aplicação de metodologias mais avançadas de biologia molecular no contexto do tecido ovariano equino, como estratégias de avaliação da qualidade do material biológico antes e após a manipulação tecidual.

A abordagem didática utilizando metodologias ativas com os estudantes de graduação em Medicina Veterinária demonstrou ser efetiva no incentivo e no desenvolvimento de habilidades práticas, promovendo o pensamento crítico e a resolução de problemas. Através da discussão de artigos científicos, foi possível estimular os alunos a se envolverem com o conteúdo e a aplicação prática de projetos de pesquisa desenvolvidos pelo grupo de pesquisa ClinEq. Em síntese, tanto a pesquisa científica quanto a abordagem educacional se unem na busca por avanços

no conhecimento e no desenvolvimento de profissionais de Medicina Veterinária mais qualificados e conscientes.

Os trabalhos desenvolvidos nesta Tese ocorrem em continuidade a linha de pesquisa consolidada entre o Grupo ClinEq-UFPeI em parceria com a Universidade do Sul de Illinois, SIU - Carbondale/USA e o Instituto Nacional de Pesquisa Agropecuária, Estação Experimental INIA La Estanzuela - Colônia/Uruguai, na qual nos comprometemos de forma assídua a uma investigação contínua e a educação de alta qualidade para o avanço da ciência.

Referências

ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 113-120, 1995.

AGUIAR, F. L. N.; GASTAL, G. D. A.; ALVES, K. A.; ALVES, B. G.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 296-309, 2020.

AGUIAR, F. L. N.; GASTAL, G. D. A.; ISHAK, G. M.; GASTAL, M. O.; TEIXEIRA, D. I. A.; FEUGANG, J. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. **Theriogenology**, v. 99, p. 124-133, 2017.

AGUIAR, F. L. N.; LUNARDI, F. O.; LIMA, L. F.; ROCHA, R. M. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHAES-PADILHA, D. M.; CIBIN, F. W. S.; RODRIGUES, A. P. R.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Insulin improves in vitro survival of equine preantral follicles enclosed in ovarian tissue and reduces reactive oxygen species production after culture. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1063-1069, 2016.

AGUIAR, F. L. N.; LUNARDI, F. O.; LIMA, L. F.; ROCHA, R. M. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CIBIN, F. W. S.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; GASTAL, M. O.; RODRIGUES, A. P. R.; APGAR, G. A.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1106-1112, 2016.

ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; GASTAL, G. D.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Spatial distribution of preantral follicles in the equine ovary. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198108, 2018.

ALVES, K. A.; ALVES, B. G.; GASTAL, G. D. A.; HAAG, K. T.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Preantral follicle density in ovarian biopsy fragments and effects of mare age. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 5, p. 867-875, 2017.

ALVES, K. A.; ALVES, B. G.; GASTAL, G. D.; DE TARSO, S. G.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149693, 2016.

ALVES, K. A.; ALVES, B.G.; ROCHA, C.D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R.F.F.; GASTAL, M.O.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E.; FIGUEIREDO, J.R.; GAMBARINI, M.L.; GASTAL, E.L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.

ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2014.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 220-228, 2011.

AZIZ, Z. V.; SAEED, M. G.; TAWFEEQ, K. T. Formalin Versus Bouin Solution for Rat Testicular Tissue Fixation: A Histo-chemical and Immunohistochemical Evaluation. **International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine**, v. 13, n. 2, p. E40267, 2023.

BASHIR, S. T.; GASTAL, M. O.; TAZAWA, S. P.; TARSO, S. G. S.; HALES, D. B.; CUERVO-ARANGO, J.; BAERWALD, A. R.; GASTAL, E. L. The mare as a model for luteinized unruptured follicle syndrome: intrafollicular endocrine milieu. **Reproduction**, v. 151, n. 3, p. 271-283, 2016.

BELOTTI, S. H. A.; FARIA, M. A. D. Relação professor/aluno. **Saberes da Educação**, v. 1, n. 1, p. 01-12, 2010.

BENAMMAR, A.; DERISOUD, E.; VIALARD, F.; PALMER, E.; AYOUBI, J. M.; POULAIN, M.; CHAVATTE-PALMER, P. The mare: a pertinent model for human assisted reproductive technologies? **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2304, 2021.

BHAT, A. H.; HUSSEIN, S. Fixation and different types of fixatives: Their role and functions: A review. **International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology**, v. 4, p. 113-119, 2021.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Reproduction**, v. 109, n. 1, p. 165-171, 1997.

BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S. M.; DA SILVA, C. B.; LINDQUIST, A. G.; BERGAMO, L. Z.; COSTA, C. B.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 243-250, 2016.

CARNEVALE, E. M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 23-30, 2008.

CARNEVALE, E. M.; CATANDI, G. D.; FRESA, K. Equine aging and the oocyte: a potential model for reproductive aging in women. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103022, 2020.

CARNEVALE, E. M.; HERMENET, M. J.; GINTHER, O. J. Age and pasture effects on vernal transition in mares. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1009-1018, 1997.

CLEAVER, B. D.; GRUBAUGH, W. R.; DAVIS, S. D.; SHEERIN, P. C.; FRANKLIN, K. J.; SHARP, D. C. Effect of constant light exposure on circulating gonadotrophin levels and hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) content in the ovariectomized pony mare. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 259-266, 1991.

COELHO, L. A.; SILVA, L. A.; REWAY, A. P.; BUONFIGLIO, D. D. C.; ANDRADE-SILVA, J.; GOMES, P. R. L.; CIPOLLA-NETO, J. Seasonal Variation of Melatonin Concentration and mRNA Expression of Melatonin-Related Genes in Developing Ovarian Follicles of Mares Kept under Natural Photoperiods in the Southern Hemisphere. **Animals**, v. 13, n. 6, p. 1063, 2023.

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). (2012). Estratégias de ensino-aprendizagem para desenvolvimento das competências humanísticas: propostas para formar médicos veterinários para um mundo melhor.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. Haematoxylin and its counterstain. **Cellular pathology technique**, p. 111-152, 1985.

CURRAN, S.; URVEN, L.; GINTHER, O. J. Distribution of putative primordial germ cells in equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. S25, p. 72-76, 1997.

CURRY, M. R.; EADY, P. E.; MILLS, D. S. Reflections on mare behavior: Social and sexual perspectives. **Journal of veterinary behavior**, v. 2, n. 5, p. 149-157, 2007.

DONADEU, F. X.; PEDERSEN, H. G. Follicle development in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 224-231, 2008.

DONADEU, F. X.; WATSON, E. D. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3-4, p. 225-242, 2007.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 6, p. 624-712, 2009.

EINSPANIER, A.; GORE, M. A. Reproduction: definition of a primate model of female fertility. **The laboratory primate**, p. 105-117, 2005.

ENGLAND, G. C. W. **Fertility and Obstetrics in the Horse**. Blackwell, 2005.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003.

FAIRE, M.; SKILLERN, A.; ARORA, R.; NGUYEN, D. H.; WANG, J.; CHAMBERLAIN, C.; GERMAN, M.S.; FUNG, J.C.; LAIRD, D. J. Follicle dynamics and global organization in the intact mouse ovary. **Developmental biology**, v. 403, n. 1, p. 69-79, 2015.

FITZGERALD, B. P.; DAVISON, L. A.; MCMANUS, C. J. Evidence for a seasonal variation in the ability of exogenous melatonin to suppress prolactin secretion in the mare. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, n. 4, p. 395-408, 2000.

GASTAL, E. L.; AGUIAR, F. L. N.; GASTAL, G. D. A.; ALVES, K. A.; ALVES, B. G.; FIGUEIREDO, J. Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral follicles: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 283-295, 2020.

GASTAL, E. L.; GASTAL O. M.; WISCHRAL, Á.; DAVIS, J. D. The equine model to study the influence of obesity and insulin resistance in human ovarian function. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.1, p. 57-70, 2011.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1320-1327, 1997.

GASTAL, G. D. A.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; PAIVA, S. O.; DE TARSO, S. G. S.; ISHAK, G. M.; BASHIR, S.T.; GASTAL, E. L. Effects of cryoprotectant agents on equine ovarian biopsy fragments in preparation for cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, p. 86-93, 2017b.

GASTAL, G. D. A.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; SOUZA, M. E. M.; VIEIRA, A. D.; VARELA JR, A. S.; FIGUEIREDO, J.; FEUGANG J.M.; GASTAL, E. L. Ovarian fragment sizes affect viability and morphology of preantral follicles during storage at 4 C. **Reproduction**, v. 153, n. 5, p. 577-87, 2017.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human reproduction update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D. G. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of cell science**, v. 119, n. 18, p. 3811-3821, 2006.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare. **Basic and applied aspects**, v. 75, 1992.

GINTHER, O. J. Reproductive seasonality and regulation of LH and FSH in pony mares. **Animal reproduction: invited papers. Montclair, NJ: Allanheld Osmun**, p. 291-305, 1979.

GINTHER, O. J. The mare: a 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 818-828, 2012.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 638-647, 2001.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BAERWALD, A. R.; PIERSON, R. A. Systemic concentrations of hormones during the development of

follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 379-388, 2005.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction (AR)**, v. 1, n. 1, p. 45-63, 2018.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 61-79, 2000.

GOMES, R. G.; LISBOA L. A.; SILVA C. B.; MAX M. C.; MARINO P. C.; OLIVEIRA R. L.; GONZÁLEZ, S. M.; BARREIROS, T. R. R.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 750-755, 2015.

GONZALEZ-ANGULO, A. Fine structure of gonads of the fetus of the horse (*Equus caballus*). **Am J Vet Res**, v. 32, p. 1665-1676, 1971.

GOSDEN, R.; NAGANO, M. Preservation of fertility in nature and ART. **Reproduction Cambridge**, v. 123, n. 1, p. 3-11, 2002.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229-238, 2016.

GUILLAUME, DANIEL; PALMER, ERIC. Effect of oral melatonin on the date of the first ovulation after ovarian inactivity in mares under artificial photoperiod. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 249-257, 1991.

HAAG, K. T; MAGALHAES-PADILHA, D. M.; FONSECA, G. R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M. O.; KING, S. S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E. L. Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 599-609, 2013.

HART, P. J.; SQUIRES, E. L.; IMEL, K. J.; NETT, T. M. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. **Biology of reproduction**, v. 30, n. 5, p. 1055-1062, 1984.

HOBRO, A.J.; SMITH, N. I. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. **Vibrational Spectroscopy**, v. 91, p. 31-45, 2017.

HOPKINS, S. M.; ALTHOUSE, G. C. Reproductive patterns of horses. **McDonald's veterinary endocrinology and reproduction**, n. Ed. 5, p. 413-433, 2003.

HSUEH, A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine reviews**, v. 15, n. 6, p. 707-724, 1994.

HSUEH, A. J.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrine reviews**, v. 36, n. 1, p. 1-24, 2015.

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

HYDE, K. A.; AGUIAR, F. L.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; GASTAL, G. D.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Preantral follicle population and distribution in the horse ovary. **Reproduction and Fertility**, v. 3, n. 2, p. 90-102, 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11ª edição. **Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan**, 2008.

KIMURA, J. H.; TAKEMOTO, S.; NAMBO, Y.; ISHINAZAKA, T.; MISHIMA, T.; TSUMAGAR, S.; YOKOTA, H. Three-dimensional reconstruction of the equine ovary. **Anatomy, Histology, Embryology**. 34: 48-51. 2005.

LOESCH, D. A.; RODGERSON, D. H. Surgical approaches to ovariectomy in mares. **Compendium**, v. 25, n. 862, p. e71, 2003.

MALPAUX, B.; THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, n. 3, p. 355-366, 1999.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 31, p. 433-442, 2007.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Ed.). **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, 2011.

MERCHANT-LARIOS, H. Ultrastructural events in horse gonadal morphogenesis. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, n. 27, p. 479-485, 1979.

MIHM, M.; EVANS, A. C. O. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 48-56, 2008.

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 3-12, 1997.

MORAES, G. D. D.; CURCIO, B. D. R.; NOGUEIRA, C. E.; PAZINATO, F. M.; FINGER, I. S.; SILVA, A. C.; VARELA JR, A. S.; CORCINI, C. D. Estudo de ovários fetais equinos: uma abordagem histológica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, p. 1116-1120, 2016.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 245-262, 2000.

NAVES, C. S.; VIEIRA, R. C.; DINIZ, E. G.; JACOMINI, J. O.; BELLETI, M. E.;

OLIVEIRA, R. C. D. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. **Ciência Rural**, v. 38, p. 416-422, 2008.

NOGUEIRA, G. P.; GINTHER, O. J. Dynamics of follicle populations and gonadotropin concentrations in fillies age two to ten months. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 482-488, 2000.

PALMER, E.; CHAVATTE-PALMER, P., P. Contribution of reproduction management and technologies to genetic progress in horse breeding. **Journal of equine veterinary science**, v. 89, p. 103016, 2020.

PIMENTEL, M. M. L.; DOS SANTOS, F. A.; DIAS, R. D. C.; DE MACÊDO, L. B.; FONSECA, Z. D. S.; ANDRÉ, W. P. P.; RIBEIRO, W. L. C. Monitoring equine estrous cycle through vaginal cytology, ultrasonography and hormone dosage. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 69-75, 2014.

RAGLE, C. A.; SOUTHWOOD, L. L.; HOPPER, S. A.; BUOTE, P. L. Laproscopic ovariectomy in two horses with granulosa cell tumors. **Journal-american Veterinary Medical Association**, v. 209, p. 1121-1124, 1996.

REVELLI, A.; PIANE, L. D.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 7, p. 1-13, 2009.

RILEY, S. C.; GIBSON, A. H.; LEASK, R.; MAUCHLINE, D. J. W.; PEDERSEN, H. G.; WATSON, E. D. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 121, n. 4, p. 553-560, 2001.

RIMON-DAHARI, N.; YERUSHALMI-HEINEMANN, L.; ALYAGOR, L.; DEKEL, N. Ovarian folliculogenesis. **Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development**, p. 167-190, 2016.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 6, p. 1021-1029, 2010.

ROMANO, M. A.; MUCCIOLO, R. G.; SILVA, A. E. D. F. Reproductive biology of the mare: oestrous cycle and ovulation time. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p. 25-28, 1998.

SANTOS, J. T.; SILVA-SANTOS, K. C.; ANDRADE, E. R.; LISBOA, L. A.; SCHNEIDER, C. L.; CIQUINI, A.; FERREIRA, R.; NÓBREGA, J. J. E.; SENEDA, M. M. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of bovine preantral ovarian follicles. **Semina: Ciências Agrárias (Londrina)**, v. 33, n. 1, p. 297-304, 2012.

SATO, K.; MIYAKE, M.; YOSHIKAWA, T.; KAMBEGAWA, A. Studies on serum oestrogen and progesterone levels during the oestrous cycle and early pregnancy in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 9, n. 2, p. 57-60, 1977.

SHARP, D. C.; KOOISTRA, L.; GINTHER, O. J. Effects of artificial light on the oestrous cycle of the mare. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 241-246, 1975.

SOUSA, F.; VIANA, J. R.; RIBEIRO, A. P. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.

STABENFELDT, H. G.; EDQVIST, E. L. Processos reprodutivos na fêmea. **Fisiologia dos animais domésticos. 11th ed. Rio de Janeiro: Roca**, p. 615, 1996.

TATE, J. L. P.; FOGLE, C. A.; BAILEY, C. S.; TATE, K. B.; DAVIS, J. W. Laparoscopic-assisted colpotomy for ovariectomy in the mare. **Veterinary Surgery**, v. 41, n. 5, p. 625-628, 2012.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 6, p. 1523-1533, 2013.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 73-82, 1997.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VAN NIEKERK, C. H.; GERNEKE, W. H.; VAN HEERDEN, J. S. Anatomical and histological observations on the reproductive tract of mares with abnormal oestrous cycles. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 44, n. 2, p. 141-152, 1973.

WALT, M.L.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; NEELY, D. P.; BRADBURY, R. Development of the equine ovary and ovulation fossa. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 27, p. 471-477, 1979.

WALTERS, K. A.; ALLAN, C. M.; HANDELSMAN, D. J. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 5, p. 149, 1-12, 2012.

WESSON, J. A.; GINTHER, O. J. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 119-129, 1981.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 28, p. 3-6, 2011.

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum

substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, n. 6, p. 1555-1562, 1999.

YOON, M. J. The estrous cycle and induction of ovulation in mares. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 165-174, 2012.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

06/07/2021

SEI/UFPel - 1354503 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

69/2021/CEEA/REITORIA
23110.012986/2021-51

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação morfológica e viabilidade de folículos pré-antrais em éguas e sua relação com enfermidades clínicas sistêmicas**”, registrada com o nº 23110.012986/2021-51, sob a responsabilidade de Bruna da Rosa Curcio - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **11 de junho de 2021**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/07/2021 a 01/07/2023
Espécie/linhagem/raça	Equina/Crioula
Nº de animais	6
Idade	2-8 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Centro de Ensino e Experimentação em Equinos da Palma - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 12986-2021

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

06/07/2021

SEI/UFPEL - 1354503 - Parecer

Presidente da CEEA

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 06/07/2021, às 10:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1354503** e o código CRC **3D1B2A68**.

Referência: Processo nº 23110.012986/2021-51

SEI nº 1354503