



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ANDRÉA PIGHINELLI CAVALLANTE

ESTIMATIVA POPULACIONAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS *IN SITU* DE
***Sotalia fluviatilis* (CETACEA, DELPHINIDAE)**

FORTALEZA

2000

ANDRÉA PIGHINELLI CAVALLANTE

**ESTIMATIVA POPULACIONAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS *IN SITU* DE
Sotalia fluviatilis (CETACEA, DELPHINIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Pesca, Área de Concentração Ciência e Tecnologia Pesqueira.

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Monteiro Neto

FORTALEZA

2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C369e Cavallante, Andréa Pighinelli.
Estimativa populacional de folículos pré-antrais *in situ* de *sotalia fluviatilis* (Cetacea, delphinidae)/ Andréa Pighinelli Cavallante. – 2000.
67 f. : il., color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2000.
Área de Concentração: Ciência e Tecnologia Pesqueira.
Orientação: Prof. Dr. Cassiano Monteiro-Neto.
- 1.Reprodução animal. 2. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

ANDRÉA PIGHINELLI CAVALLANTE

**ESTIMATIVA POPULACIONAL DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS *IN SITU* DE
Sotalia fluviatilis (CETACEA, DELPHINIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Pesca, Área de Concentração Ciência e Tecnologia Pesqueira.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cassiano Monteiro-Neto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Manuel A. A. Furtado-Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais **ANTÔNIO NERIS
CAVALLANTE** e **MARIA LÚCIA
PIGHINELLI CAVALLANTE** pelo amor,
dedicação, exemplo de dignidade e apoio com
que sempre me cercaram.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Cassiano Monteiro-Neto, pelo crédito dado, aceitando a orientação e elaboração deste trabalho.

Ao Dr. José Ricardo de Figueiredo, por ceder o laboratório, para a realização dos cortes histológicos dos ovários.

À Renata Ramos, pela ajuda na determinação das idades dos animais em estudo.

Ao Dr. Fernando Rosas pela amizade, incentivo, críticas e sugestões, principalmente na hora do desespero.

Aos companheiros do Grupo de Estudo de Cetáceos do Ceará pela colaboração prestada durante as necrópsias e coleta de material.

À Ana Paula Ribeiro Rodrigues pela ajuda na parte histológica e sugestões no trabalho.

Aos professores e funcionários do Curso de Mestrado em Engenharia de Pesca da UFC pelo apoio logístico e institucional.

À FUNCAP (Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa) pelo apoio financeiro

À Adriana e Yara, amigas especiais e de longa data, que mesmo distantes continuaram apoiando, torcendo e acreditando na realização deste trabalho.

Às amigas Alexandra, Cristine, Luisa, Poliana e Renata pelos ótimos momentos de convivência, constante incentivo e apoio.

Aos que não foram citados, mas contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

E por fim, mas não por último, a Deus por ter me dado saúde para vencer mais uma etapa.

RESUMO

O boto cinza, *Sotalia fluviatilis*, é uma espécie de cetáceo costeira ameaçada pela pesca artesanal, sendo necessário um estudo da biologia reprodutiva, para a administração e conservação das populações que estão sujeitas à mortalidade por ação antrópica. O estudo de folículos pré-antrais *in situ* permite uma melhor compreensão da fase pré-antral da foliculogênese, pouco conhecida nos cetáceos em geral, e totalmente desconhecida em *S. fluviatilis*. A análise quantitativa de folículos pré-antrais foi realizada em ovários de *S. fluviatilis* recuperados na costa do Ceará entre 1997-1999. A idade dos exemplares em estudo variou de 0 a 23 anos, com idade de maturação sexual acima de 6 anos. A população folicular pré-antral analisada, apresentou-se totalmente degenerada, possivelmente em decorrência do tempo “*pós-mortem*”. Ainda assim, foram observadas diferenças significativas entre os estágios de maturação sexual, onde animais imaturos apresentaram uma média de 1.162.460 folículos, enquanto os exemplares maduros apresentaram em média 66.270 folículos. Em relação a posição anatômica do ovário foi observado que, em média, o ovário esquerdo apresentou um número mais elevado de folículos quando comparado ao lado direito. Essa diferença foi significativa somente para animais imaturos. Não houve uma diferença significativa com relação ao peso do ovário direito e esquerdo dos exemplares imaturos e maduros. O número de folículos apresentou uma relação negativa com a idade e peso do ovário, embora o peso tenha apresentado uma relação positiva com a idade. Tais resultados mostraram que a população folicular de *S. fluviatilis* pode ser afetada por diversos fatores, entre eles estágio reprodutivo, idade, peso ovariano e posição anatômica do ovário. Os dados quantitativos da foliculogênese descrito neste trabalho poderão servir como parâmetro para futuros estudos *in vivo* ou *in vitro* da foliculogênese em *S. fluviatilis*. Desta forma, novas informações acerca dos folículos pré-antrais de *S. fluviatilis* poderão ser obtidos, gerando oportunidade para a realização de novas pesquisas, visando a elucidação da foliculogênese da fase pré-antral na espécie, o que contribuirá no futuro para um melhor aproveitamento do seu potencial oocitário.

Palavras-chave: Folículo pré-antral. Oócito. Reprodução. Ovário. *Sotalia fluviatilis*.

ABSTRACT

Tucuxi, *Sotalia fluviatilis*, a coastal cetacean species threatened by artisanal fishing, needs a reproductive biology study in order to manage and preserve the populations subject to mortality for antropic action. A *in situ* of the preantral follicles allows a better understanding of the preantral phase of the folliculogenesis, little known in cetaceans and totally unknown in *S. fluviatilis*. Quantitative analysis of the preantral follicle was made in ovarian of *S. fluviatilis* recovered on the Ceara coast between 1997-1999. The age of the studied sample varied from 0 to 23 years, being sexual maturation above 6 years. The population preantral follicular analysed, was completely degenerate, possibly because of “*pos-mortem*” time. Even so, significant difference were observed among sexual maturation stage, whwere immature animals showed na averege of 1.162.460 follicles, while in matures animals the averege was 66.270 follicles. Due to anatomic position of the ovarian, it was observed that the left ovarian had a higher number of follicles when compared to the right one. This difference was significant only for immature animals. There wasn't a significant difference related to weight of right and left ovarian of mature and imature sample. Number of follicles showed a negative relation with age and weight of the ovarian, although weight had a positive relation with age. These results indicate that the population follicular fo *S. fluviatilis* may be affected by many factors such as: reproductive stage, age, ovarian weight and anatomical position of the ovary. Quantitative data of the foliculogenesis described can be used as a parameter for future studies *in vitro* or *in vivo* of the foliculogenesis of *S. fluviatilis*. From this, new information about preantral follicles of *S. fluviatilis* can be acquired, leading to new reserch to explain the foliculogenese of preantral follicles phase of the species, contributing to a better utilization of oociterio potencial.

Keywords: Preantral follicles. Oocyte. Reproduction. Ovary. *Sotalia fluviatilis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Diagrama esquemático do ovário de mamíferos.	20
Figura 2-	Exemplar de <i>Sotalia fluviatilis</i> , indicando a posição da linha neonatal (LN) e as camadas de crescimento GLG.	32
Figura 3-	Secção longitudinal do dente de <i>Sotalia fluviatilis</i> , indicando a posição da linha neonatal (LN) e as camadas de crescimento GLG.	39
Figura 4-	Folículos degenerados: a) retração do oócito (Ro); b) retração do oócito (Ro), desorganização das células da granulosa (Dcg).	41
Figura 4.1-	Folículos degenerados: c) picnose da célula da granulosa (Pcg) e aumento de volume (AV); d) aumento de volume da célula da granulosa.	41
Figura 5-	Cicatrizes ovulatórias, encontradas nos ovários dos exemplares g (a e B).	42
Figura 5.1-	Cicatrizes ovulatórias, encontradas nos ovários dos exemplares d (c) e e (d).	42
Figura 6-	Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários esquerdo de exemplares imaturos e maduros de <i>Sotalia fluviatilis</i> da costa do Ceará.	44
Figura 6.1-	Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários direito de exemplares imaturos e maduros de <i>Sotalia fluviatilis</i> da costa do Ceará.	44
Figura 7:	Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários direito e esquerdo, de exemplares de <i>Sotalia fluviatilis</i> da costa do Ceará.	46

Figura 8-	Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários direito e esquerdo de exemplares imaturos de <i>Sotalia fluviatilis</i> da costa do Ceará.	47
Figura 9-	Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários direito e esquerdo de exemplares maduros de <i>Sotalia fluviatilis</i> da costa do Ceará.	48
Figura 10-	Médias e intervalos de confiança (95%) dos pesos dos ovários (g) em relação a sua posição (lado direito e esquerdo) em fêmeas imaturas e maduras de <i>Sotalia fluviatilis</i> da costa do Ceará.	50
Figura 11-	Relações lineares entre a população folicular pré-antral e a idade das fêmeas, separados em função do lado ovariano.	51
Figura 12-	Relações lineares entre a população folicular pré-antral e peso dos ovários, separados em função do lado ovariano.	52
Figura 13-	Relações lineares entre o peso dos ovários e a idade das fêmeas, separados em função do lado ovariano.	53

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1-	Dados referentes aos exemplares da espécie <i>Sotalia fluviatilis</i> , utilizados no presente estudo.	33
Tabela 2-	Dados referentes à idade (anos) dos exemplares da espécie de <i>Sotalia fluviatilis</i> , estimada com base nas Growth Layer Groups (GLGs).	40
Tabela 3-	Classificação das fêmeas de <i>Sotalia fluviatilis</i> recuperados na costa do Ceará, quanto ao estágio de maturação sexual.	42
Tabela 4-	Tamanho da amostra (n), médias e intervalos de confiança e teste-t comparando-se as populações de folículos pré-antrais em relação ao estágio de maturação sexual das fêmeas e o lado do ovário.	43
Tabela 5-	Correlação entre os pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se as populações pré-antrais em relação ao lado do ovário.	45
Tabela 6-	Correlação entre os pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se as populações de folículos pré-antrais em relação ao lado do ovário para fêmeas imaturas.	47
Tabela 7-	Correlação entre os pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se as populações de folículos pré-antrais em relação ao lado do ovário para fêmeas maduras.	48
Tabela 8-	Correlação entre os pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se os pesos dos ovários (g) em relação a sua posição (lado direito e esquerdo) em fêmeas imaturas.	49

Tabela 9- Correlação entre os pares de ovários e nível de sugnificância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se os pesos dos ovários (g) em relação a sua posição (lado direito e esquerdo) em fêmeas maduras. 49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
2.1	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Descrição da Espécie Estudada	16
3.2	Determinação da Idade em Pequenos Cetáceo	18
3.3	Morfologia do Ovário em Cetáceos	19
3.4	Oogênese	21
3.5	Foliculogênese	22
3.6	Classificação dos Folículos Ovarianos	25
3.7	População Folicular	27
3.8	Atresia Folicular	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Determinação da Idade	33
4.1.1	<i>Preservação e Análise dos Dentes</i>	33
4.2	Estudo da População Folicular	34
4.2.1	<i>Preservação e Análise dos Ovários</i>	34
4.3	Análise Estatística	35
4.3.1	<i>Comparações entre Médias</i>	35
4.3.1.1	<i>Estudo da População Folicular</i>	35
4.3.1.1.1	Variações na População Folicular em Relação ao Estágio de Maturação Sexual	36
4.3.1.1.2	Variações na População Folicular em Relação ao Lado do Ovário	36
4.3.1.2	<i>Variações no Estudo do Peso do Ovário em Relação ao Lado Ovariano</i>	37
4.3.2	<i>Relações entre as Variáveis</i>	37
5	RESULTADOS	39
5.1	Determinação da Idade	39
5.2	Estudo da População Folicular	40
5.2.1	<i>Aspectos Histológicos</i>	40
5.2.2	<i>Caracterização do Estágio de Maturação Sexual</i>	41

5.2.3	<i>Variações na População Folicular Pré-Antral em Relação ao Estágio de Maturação Sexual</i>	43
5.2.4	<i>Variações na População Folicular Pré-Antral em Relação ao Lado do Ovário</i>	45
5.2.5	<i>Variações no Peso do Ovário em Relação ao Lado Ovariano</i>	49
5.2.6	<i>Relações entre as Variáveis</i>	51
5.2.6.1	<i>Número de Folículos em Função da Idade do Animal</i>	51
5.2.6.2	<i>Número de Folículos em Função do Peso do Ovário</i>	52
5.2.6.3	<i>Peso do Ovário em Função da Idade do Animal</i>	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A ordem Cetácea, que compreende botos, golfinhos e baleias, é a mais numerosa e diversificada entre os mamíferos marinhos. Nesta ordem estão incluídos os pequenos cetáceos, que pertencem à subordem Odontoceti constituída por cetáceos com dentes (WATSON, 1985). O boto-cinza, *Sotalia fluviatilis* (conhecido por tucuxi na região amazônica), é a espécie de pequeno cetáceo mais ameaçada pela atividade da pesca artesanal no estado do Ceará (ALVES-JUNIOR *et al.*, 1996). Por esta razão, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), apesar de a considerar como uma das espécies da fauna Brasileira ainda insuficientemente conhecidas, já estabeleceu um plano de ação para sua preservação (IBAMA, 1998).

Os cetáceos, apesar do seu importante papel como indicadores úteis da produtividade e “saúde” dos ecossistemas, estão entre os vertebrados menos estudados no mundo. Isto é devido à grande dificuldade para obtenção de dados, quer sejam anatômicos, fisiológicos ou etológicos. E também por serem animais aquáticos e não estarem sujeitos à pesca comercial. (KATOMA & WHITEHEAD, 1988)

Anualmente, cerca de 100.000 espécimens de cetáceos são capturados acidentalmente em aparelhos de pesca no mundo inteiro, resultando, na maioria dos casos, na morte desses animais (DI BENEDITTO, 1997). A maior parte das informações sobre a biologia de muitas espécies de cetáceos são provenientes de exemplares capturados acidentalmente em redes de pesca ou encalhados acidentalmente na costa.

Segundo HOHN *et al.* (1985), a estimativa da idade e o estudo da biologia reprodutiva são importantes para fornecer informações para a administração de populações que estão sujeitas á mortalidade por ação antrópica. Vários trabalhos tratam da biologia reprodutiva de cetáceos, mas apenas HARRISON & BROWELL (1971), HARRISON *et al.* (1972), BEST & Da SILVA (1984), RAMOS (1997) e ROSAS (2000) estudaram os parâmetros reprodutivos de *S. fluviatilis*. Estudos sobre folículos ovarianos pré-antrais e antrais em *S. fluviatilis* não foram publicados até o momento.

O ovário dos mamífero, de um modo geral, contém milhares de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, entretanto 99,9% desses folículos morrem ou tornam-se inviáveis (atresia) durante a vida reprodutiva da fêmea, reduzindo desse modo, o potencial reprodutivo do animal (RODRIGUES *et al.*, 1998).

O estudo de folículos pré-antrais *in situ*, permite uma melhor compreensão da fase pré-antral da foliculogênese, pouco conhecida em cetáceos, e totalmente desconhecida em *S. fluviatilis*, podendo também contribuir em estudos futuros, dando subsídios para a utilização da biotécnica de manipulação (isolamento, criopreservação e cultivo) de folículos ovarianos pré-antrais. Esta nova biotécnica tem como objetivo, maximizar a utilização do potencial oocitário das fêmeas de mamíferos de alto valor genético, bem como daqueles em via de extinção (FIGUEIREDO *et al.*, 1995a), como é o caso de *S. fluviatilis*.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar aspectos da biologia reprodutiva, com ênfase no estudo da população de folículos pré-antrais, de *Sotalia fluviatilis*, espécie supostamente ameaçada pela pesca artesanal do estado do Ceará. Pode também fornecer subsídios, para estudos futuros da biotécnica de manipulação de folículos pré-antrais, utilizada para espécies em perigo de extinção.

2.1 Objetivos Específicos

1. Analisar quantitativamente a população folicular pré-antral *in situ* da espécie *S. fluviatilis*;
2. Comparar as populações foliculares pré-antral entre os ovários direito e esquerdo;
3. Estudar o efeito da fase reprodutiva da fêmea *de S. fluviatilis* (animais imaturos e maturos), peso ovariano e idade sobre a população de folículos pré-antrais.

3 Revisão de Literatura

3.1 Descrição da Espécie Estudada

O boto cinza, *Sotalia fluviatilis* (GERVAIS, 1853) é um delfínídeo que na sua morfologia externa apresenta uma coloração azulada ou acinzentada escura na região dorsal e nadadeiras, passando a cinza claro, rosado ou branco na região ventral. Os animais desta espécie apresentam uma listra que vai do olho até a nadadeira peitoral e nas áreas mais claras na região ventral das nadadeiras, e possuem uma demarcação tênue entre o rostro e a fronte. As nadadeiras peitorais são longas e largas e a dorsal é pequena e triangular (BOROBIA & SERGEANT, 1989; SIMÕES-LOPES & XIMENES, 1990; JEFFERSON *et al.*, 1993). Exemplos desta espécie apresentam comprimento corpóreo geralmente inferior a 2,0 m, sendo considerado um dos menores delfínídeos. No tocante à dieta, alimentam-se de cefalópodes e peixes pelágicos e demersais. A maioria dos peixes consumidos, habita águas rasas e com fundo de lama e/ou areia, ou vivem em ambientes estuarinos (BOROBIA & BARROS, 1989; BOROBIA *et al.*, 1990).

Segundo BOROBIA *et al.* (1991) a espécie *Sotalia fluviatilis* apresenta dois ecótipos: um marinho e outro fluvial. O ecótipo fluvial é endêmico da bacia do Rio Amazonas, encontrado desde Belém, no Brasil, até os rios do território peruano (DA SILVA & BEST, 1996). Quanto ao ecótipo marinho, este apresenta uma ampla distribuição ao longo da costa tropical e subtropical das Américas do Sul e Central, sendo registrado desde Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°35'S; 48° 34'W) (SIMÕES-LOPES, 1988) até Honduras (15° 58'N; 85° 42'W) (DA SILVA & BEST, 1996).

A diferenciação entre essas dois ecótipos, baseia-se na morfometria externa e óssea entre os indivíduos, sendo os da forma marinha maiores (BOROBIA, 1989; DA SILVA & BEST, 1996). Recentemente, estudos comparando as sequências de DNA mitocondrial de exemplares do ecótipo fluvial e espécimes marinhas, de cinco diferentes localidades do litoral brasileiro, sugeriram que ambos sejam geneticamente distintos à nível populacional (FURTADO-NETO 1998; FURTADO-NETO, 2000)

De acordo com BEST & DA SILVA (1984) o ecótipo fluvial apresenta um período de gestação de dez meses, com nascimentos aparentemente sazonais, com picos entre outubro e novembro. A maturidade sexual para os machos e fêmeas, é atingida com comprimento do corpo de 140 cm, e entre 128,5 cm e 138,5 cm, respectivamente.

Para a forma marinha, a maturidade sexual ocorre após o sexto ano de vida, em machos com mais de 180 cm e em fêmeas com mais de 170 cm. Possuem um período de gestação de doze meses, com nascimentos estimados entre os meses de dezembro e fevereiro (RAMOS, 1997).

Embora, a forma marinha seja muito freqüente na costa Sudeste do Brasil, informações sobre seus ciclos reprodutivos são escassos. Características do crescimento e da biologia reprodutiva dessa espécie foram estudadas em espécimens encontrados mortos nas praias ou em redes de pesca em São Paulo, Rio de Janeiro Paraná, Brasil (SCHMIEGELOW, 1990; ZANELATO *et al.*, 1996; RAMOS, 1997;). Tanto a forma marinha como a fluvial, são vítimas muito comuns das redes de pesca, onde acabam emalhadas acidentalmente (MONTEIRO-NETO, 2000).

Indivíduos dessa espécie tem sido avistados em diversas localidades da costa do estado do Ceará, (ALVES-JUNIOR *et al.*, 1996), apresentando uma interação competitiva junto às artes de pesca. Isto leva geralmente ao emalhamento e morte desses animais, acarretando impactos negativos na manutenção de tal população (MONTEIRO-NETO, 1993; MONTEIRO-NETO, 2000).

Considerando que a forma marinha apresenta hábitos tipicamente costeiros, e costuma ocorrer em baías e desembocaduras de rios (BOSSENECKER, 1978), a espécie vem sofrendo impactos decorrentes da destruição do meio ambiente pela ocupação humana, seja por poluição, assoreamento de rios e estuários ou destruição de manguezais, devido ao desenvolvimento do turismo (BOROBIA & ROSAS, 1991; HETZEL & LODI, 1993). A magnitude desses impactos em populações locais, somados ao potencial de expansão da atividade pesqueira, são ainda desconhecidos.

PERRIN (1988) mencionou que algumas populações da espécie na região Amazônica encontram-se em risco de extinção. A espécie também foi listada na Convenção do Acordo Internacional de Espécies em Perigo da Fauna e Flora Selvagem - Apêndice I, (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora - CITES) desde 1982 como insuficientemente conhecida pela União de Conservação Mundial (World Conservation Union) - IUCN (KLINOWSKA, 1991), e incluída na lista do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) das espécies da fauna Brasileira insuficientemente conhecida e presumivelmente ameaçada de extinção. *Sotalia fluviatilis* é protegida, no Brasil pela Lei Federal das Pescas (Decreto Lei Nº 73632 de fevereiro de 1967).

3.2 Determinação da Idade em Pequenos Cetáceos

As espécies de cetáceos odontocetos são monofiodontes e geralmente homodontes, apresentando um padrão repetitivo de crescimento em todos os dentes (MYRICK, 1991). Nessas espécies, o dente consiste de três elementos estruturalmente diferentes, esmalte, dentina e cimento (VAN UTRECHT, 1981). Estes elementos são depositados com regularidade em camadas de crescimento, representando um registro natural do processo de desenvolvimento do animal (BOYDE, 1980). O esmalte é formado no estágio ainda fetal sendo completamente concluído antes do nascimento, portanto não pode ser utilizado para determinação da idade (OHSUMI, *et al.*, 1971).

Simultaneamente ao início da formação do esmalte, inicia-se a deposição de dentina pré-natal, representando um registro de grande parte da vida fetal (BOYDE, 1980). Com o nascimento, a deposição de dentina (dentina pós-natal) continua lentamente e durante toda a vida do animal ou até que a cavidade polpar seja obstruída (MYRICK, 1991). A deposição das camadas de cimento ocorre no espaço do alvéolo dentário, durante toda a vida, representando junto com a dentina pós-natal, um registro contínuo da vida após o nascimento (MYRICK, *op. cit.*).

Segundo MYRICK *op. cit.*, a deposição das camadas de dentina e de cimento, ocorrem ao mesmo tempo e na mesma sequência, seguindo o mesmo padrão em todos os dentes de um indivíduo.

A contagem das camadas de dentina e de cimento em dentes de pequenos cetáceos, para se estimar a idade, foi definida pela International Whaling Commission (IWC, 1980) como “Grupo de Camadas de Crescimento” (“Growth Layer Group” – GLG). Em geral, uma GLG corresponde à quantidade de tecido acumulado durante um ano (CRESPO *et al.*, 1994). Este método tem sido utilizado para a determinação de idade de várias espécies de pequenos cetáceos, como *Stenella attenuata*, *S. coeruleoalba*, *Tursiops truncatus* e *Phocoena sinus* (SERGEANT *et al.*, 1973; KASUYA, 1976; PERRIN *et al.*, 1976; COCKCROFT & ROSS, 1989; HOHN *et al.*, 1989, 1996).

Para a forma marinha de *Sotalia fluviatilis*, VAN UTRECHT (1981) foi o primeiro a fazer citação sobre a leitura das camadas de crescimento, observando uma deposição não paralela de dentina em cortes (120µm) de dentes de animais com mais de sete anos de idade. No entanto, BOROBIA (1989) realizando cortes de 75µm não observou tal deposição, e sugeriu o uso de secções mais finas, para tornar mais precisa a determinação de idade em *S.*

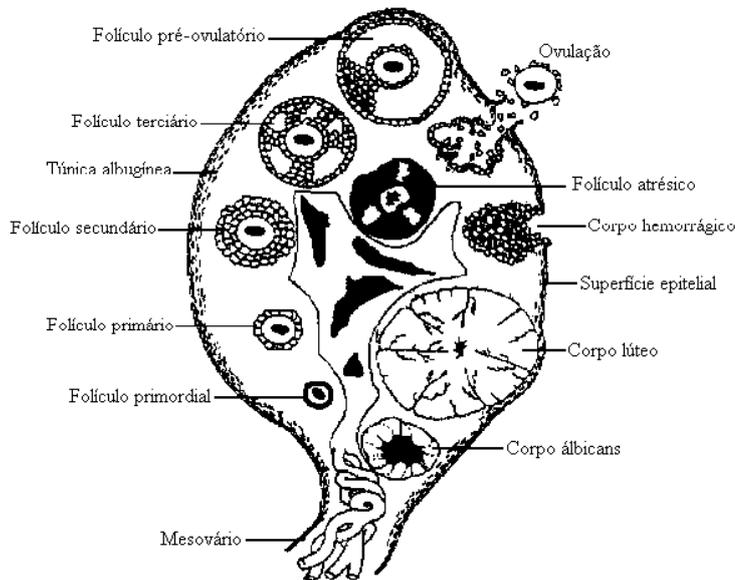
fluviatilis. Posteriormente, a técnica de secções finas foi utilizada para determinação de idade de indivíduos que ocorreram nos litorais de Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (SCHMIEGELOW, 1990; RAMOS, 1997; ZANELATTO *et al.*, 1996).

3.3 Morfologia do Ovário em Cetáceos

Os ovários em cetáceos, assim como nos demais mamíferos, são órgãos pares, situados no lado dorso lateral da cavidade abdominal, exatamente caudal aos rins. Possuem uma superfície lisa quando em anestro e uma forma ovalada (SLIJPER, 1966; PEI-XUN *et al.*, 1984; BANKS, 1992). Apresentam-se revestidos por um epitélio superficial, e como na maioria dos animais, são formados por duas zonas diferentes: o córtex ou zona parenquimal, e a medula ou zona vascular (BANKS, 1992).

A região cortical contém grande quantidade de células e tecidos em atividade, sendo os mais importantes os folículos ovarianos atrésicos e não atrésicos, corpos lúteos, corpos alvíscos, células intersticiais, nervos, fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 1) (HAFEZ, 1995; MURDOCH, 1996; PERRIN & DONOVAN, 1984). Ao redor do córtex há uma densa cápsula de tecido conjuntivo ou túnica albugínea. A medula é caracterizada pela presença de grandes vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e algumas estruturas embrionárias remanescentes (BANKS, 1992), sendo essa região responsável pela nutrição e sustentação do ovário (SMITH *et al.*, 1994).

Figura 1- Diagrama esquemático do ovário de mamífero.



Fonte: Adaptado de MURDOCH, 1996

A respeito da funcionalidade do ovário em cetáceos, SLIJPER (1958) descreve que nos odontocetos, o ovário esquerdo é mais funcional, o que foi confirmado pelo estudo de SERGEANT (1962), que observou 43 ovários de *Globicephala melaena*, dos quais 70% apresentavam o ovário esquerdo mais funcional. Já nos mysticetos, OHSUMI (1964) observou que ambos os ovários são funcionais, ao contrário dos delfínídeos, onde ocorrem dois casos: a) a funcionalidade do ovário direito ocorre pouco mais tarde que no ovário esquerdo, (*Delphinapterus leucus*, *Grampus griseus*, *Globicephala melaena*, *G. scammoni*, *Orcinus orca* e *Feresa attenuata*); b) o ovário esquerdo é funcional por um tempo relativamente longo (*Phocaenoides dalli*, *Lagenorhynchus obliquidens*, *Tursiops truncatus*, *Delphinus delphis*, *Stenella attenuata* e *Stenella caeruleoalba*).

O ovário exerce duas funções importantes: uma endócrina, sob a influência, principalmente, dos hormônios adeno-hipofisários FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), envolvendo a produção de estrógeno, progesterona e diversos peptídeos; e outra função exócrina, que está relacionada com a produção e liberação dos gametas femininos, resultado de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese. Essas duas funções são interdependentes, complementares e necessários para o sucesso da reprodução (BANKS, 1992; RODRIGUES, 1997).

3.4 Oogênese

A oogênese é melhor definida como o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) culminando com a formação do oócito haploide fecundado (BAKER, 1982; RUSSE, 1983). Tal processo, nos mamíferos, é iniciado durante a vida fetal, desenvolvendo-se por meses ou anos nos animais adultos. As células germinativas primordiais, migram para as cristas germinativas do endométrio do saco vitelíneo e dentro do ovário se multiplicam ativamente (WASSARMAN, 1988; BANKS, 1992; GORDON, 1995).

De acordo com MONNIAUX (1997), a oogênese envolve três fases: a fase de proliferação; a fase meiótica de formação do oócito primário, e a fase de degeneração das células germinais. Da última divisão das células germinativas primordiais surgem duas células germinais com diferentes funções. Imediatamente, uma célula germinativa, inicia a mitose dando origem a células oogoniais e a outra permanece na interfase dividindo-se periodicamente dando origem a novas células germinativas primordiais que irão se diferenciar em oogônias (RUSSE, 1983). As oogônias dividem-se repetidas vezes e quando entram na prófase da primeira divisão meiótica, se transformam em ovócitos primários antes, ou logo depois do nascimento na maioria das espécies (BANKS, 1992; HILSCHER *apud* AMORIM, 1998). Na meiose, os oócitos avançam para os estágios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno (HIRSHFIELD, 1991).

Durante a prófase I da meiose, os oócitos, já chamados de oócitos primários, sofrem degeneração e redução do seu número (HIRSHFIELD *op. cit.*). Os oócitos que sobrevivem à degeneração são detidos no estágio diploteno da primeira divisão meiótica (MONNIAUX *et al.*, 1997), permanecendo assim até atingir a puberdade.

Um pouco antes da ovulação, em resposta ao pico pré-ovulatório de FSH/LH, o oócito reinicia o processo de meiose (DOWNS, 1993), seguindo os estágios de metáfase I, anáfase I e telófase I, onde ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar, levando à formação do oócito secundário (BETTERIDGE *et al.*, 1989). Em seguida, inicia-se a segunda divisão meiótica (divisão equacional), não passando o oócito secundário pelo estágio de prófase e seguindo diretamente à metáfase II. Ocorre então uma segunda interrupção da meiose, entrando o oócito no segundo período de repouso (BETTERIDGE *et al.*, 1989, GORDON, 1995).

A retomada da meiose ocorrerá somente se o oócito for fertilizado. Ocorrendo a fertilização, o oócito completará a meiose com o segundo corpúsculo polar sendo eliminado (BAKER, 1982; BETTERIDGE *et al.*, op cit.), finalizando o processo de oogênese.

3.5 Foliculogênese

A foliculogênese é um processo fisiológico, que ocorre simultaneamente à oogênese. Corresponde a ativação, crescimento e maturação folicular, desde o estágio de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios (FIGUEIREDO *et al.*, 1995a).

Um folículo ovariano é uma agregação esférica de células que contém o gameta em desenvolvimento, sendo considerado como a unidade morfofuncional do ovário de mamífero. O folículo apresenta duas funções: proporcionar o ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito e a produção de hormônios tanto esteróides como peptídeos (BANKS, 1992).

Durante a oôgenese, as oogônias entram na profase I da primeira divisão meiótica se transformam em oócitos primários. Concomitantemente à diferenciação dos oócitos primários, uma camada única de células epiteliais achatadas, as células foliculares, se associam e circundam o oócito primário. Neste estágio, o complexo é conhecido como folículo primordial (BAKER, 1982; BANKS, 1992; DOWNS, 1993; FORTUNE, 1994). Entretanto, quando os folículos primordiais são formados, ocorre uma parada da meiose em prófase I do oócito, e entram no período quiescentes por meses ou anos (BAKER, op. cit.; HIRSHFIELD, 1992).

Pouco se conhece sobre os fatores que irão permitir que alguns folículos primordiais entrem em crescimento enquanto outros permaneçam inertes. Nem todos os folículos primordiais são produzidos igualmente, diferindo na linhagem celular da população das células foliculares e no tempo de duração do desenvolvimento embrionário, quando seus oócitos entram em meiose. Cada folículo primordial é dotado de uma única combinação dessa características (HIRSHFIELD, 1992).

Segundo MARIANA *et al.* (1991) e MONNIAUX *et al.* (1997), a população de folículos primordiais é heterogênea. Tal heterogeneidade na composição de suas células foliculares dos folículos primordiais pode explicar a grande diversidade no comprimento do período de dormência dos folículos no pool dos folículos primordiais (HIRSHFIELD, 1992).

De acordo com MARIANA *et al.* (1991) e FORTUNE (1994), alguns folículos primordiais são ativados durante a vida fetal em algumas espécies como primatas e ruminantes (RUSSE, 1983), mas em outras, esta ativação somente começará a partir do início do período neonatal, como em roedores e coelhos. A proliferação celular é retomada somente quando o folículo primordial quiescente começa a crescer, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991).

A ativação dos folículos primordiais corresponde à passagem dos folículos do pool de reserva para o pool de folículos em crescimento. Os mecanismos envolvidos na ativação do crescimento, desenvolvimento e diferenciação dos folículos primordiais quiescentes não são totalmente conhecidos (BAKER, 1982; RUSSE, 1983) até mesmo em ovários humanos (GOUGEON e CHAINY, 1987).

Segundo LUNENFELD *et al.* (1975), dois fatores intraovarianos podem influenciar o início do crescimento folicular: o tamanho do pool de folículos pequenos que não estão em crescimento e a degeneração dos folículos grandes, os quais aparentemente liberam uma substância que retrai o início do desenvolvimento folicular. Entretanto, BETTERIDGE *et al.* (1989) sugerem que o hormônio FSH pode ser responsável pela ativação dos folículos primordiais, sendo, os estágios iniciais do crescimento folicular, pouco dependentes do suporte de gonadotrofinas (BAKER & HUNTER, 1978).

O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a proliferação das células foliculares e multiplicação das organelas celulares (RUSSE, 1983; MARIANA *et al.*, 1991). Tais folículos adquirem várias características morfológicas durante o crescimento. O aumento do tamanho do oócito com a cromatina nuclear passando do estágio de paquíteno para diplóteno, acompanhando a síntese de RNA no oócito (ERICKSON, 1966b; BAKER, 1982; MONNIAUX *et al.*, 1997), além da mudança na forma das células foliculares de achatadas para cubóides e sua multiplicação por mitose (BAKER, 1982; ERICKSON, 1986). A ativação do folículo primordial o transforma em folículo primário, e com o aumento da população das células foliculares em folículo secundário.

De acordo com MONNIAUX *et al.* (1997) o crescimento folicular é um processo contínuo, finalizando na ovulação. Durante este crescimento, principalmente do folículo secundário, observa-se que as células foliculares, que formam a membrana da granulosa, são separadas dos oócitos pela zona pelúcida (ROY & GREENWALD, 1985; BANKS, 1992). As células do estroma se diferenciam em duas camadas a teca folicular interna e a externa (BANKS *op. cit.*; PERRIN & DONOVAN, 1984).

A transição do folículo secundário para o terciário é gradual e contínua. As células se multiplicam havendo um aumento na produção e acúmulo de um fluido que conduz ao desenvolvimento da cavidade folicular ou antro (PERRIN e DONOVAN, 1984). O índice de proliferação das células da granulosa aumenta com o aumento do tamanho do folículo (HIRSHFIELD, 1991).

O crescimento dos folículos terciários é dividido em duas fases: uma inicial e outra terminal. No crescimento inicial, os folículos terciários são poucos sensíveis às variações de gonadotrofinas e suas necessidades em FSH e LH são baixas, significando que os hormônios gonadotróficos nessa etapa não são absolutamente necessários para a proliferação das células da granulosa e tecais (RODRIGUES, *et al.* 1998). Na fase terminal os folículos terciários são dependentes de gonadotrofinas hipofisárias (MONNIAUX *et al.*, 1993) as quais aumentam a atividade esteroideogênica acarretando no aumento da produção e acúmulo de esteróides, principalmente estradiol que é fisiologicamente importante à reprodução (IRELAND, 1987).

Nessa fase, o FSH é responsável pela proliferação das células da membrana da granulosa e o sinergismo de FSH e LH promove o aumento das camadas da teca, da vascularização, da formação do antro e um aumento no número de receptores gonadotróficos nas células da granulosa e tecais, como resultado do desenvolvimento folicular (LUNENFELD, *et al.*, 1975)

A fase terminal pode ser dividida em três etapas: recrutamento, seleção e dominância. O recrutamento é um evento gonadotrófico-dependente, durante o qual um grupo de folículos adquire habilidade para começar a crescer em resposta a um meio com estímulo gonadotrófico suficiente para permitir o progresso em direção à ovulação (IRELAND, 1987; LUCY *et al.*, 1992). O estímulo para que ocorra o recrutamento parece ser uma pequena elevação dos níveis de FSH (FORTUNE, 1994), sendo que o número de folículos recrutados por tal elevação, pode depender de dois fatores: o tamanho do grupo de folículos capazes de responder ao aumento do nível de gonadotrofinas e a duração da sua amplitude. O número de folículos recrutados é superior ao necessário para a ovulação, o que assegura, se algo acontecer ao folículo destinada a ovular, outro poderá ser prontamente selecionado (FORTUNE, 1994).

Após o recrutamento, inicia-se a fase de seleção, na qual um folículo ou mais, dependendo da espécie animal, emerge do grupo de folículos recrutados e continua a crescer, enquanto que os demais folículos recrutados diminuem em tamanho (ERICKSON, 1986). A seleção pode ser entendida como um processo de alto nível de organização, englobando

citodiferenciação das células intersticiais, granulosa, teca, e dos oócitos (ERICKSON, *op. cit.*). Além disso, o mecanismo de seleção envolve um declínio nos níveis de FSH (GINTER *et al.*, 1996).

O folículo selecionado para a dominância, continua a crescer e torna-se funcionalmente diferenciado, pronto para a ovulação. A dominância, em decorrência do declínio de FSH, é maneira pela qual os folículos selecionados inibem um novo recrutamento bem como o crescimento dos folículos à ele subordinados (LUCY *et al.*, 1992). Através da ação sinérgica das gonadotrofinas (FSH e LH), o folículo libera o oócito, para a ovulação, marcando o final da foliculogênese (FORTUNE *et al.*, 1991), onde os folículos que não conseguem chegar até o estágio final de desenvolvimento, tornam-se atresícos (HIRSHFIELD, 1991).

3.6 Classificação dos Folículos Ovarianos

A população folicular, de um ovário, pode ser classificada de acordo com: a) a viabilidade, classificando-se como normais ou atresícos; b) com o tamanho, tendo por base a medida do diâmetro e c) o grau de evolução, através da observação do número de camadas de células da granulosa e da presença ou ausência do antro (SAUMANDE, 1981). Tal classificação varia de acordo com o autor, sendo esta população folicular bastante heterogênea (MARIANA *et al.*, 1991).

DUFOUR e GUILBAULT (1984), classificaram os folículos como normais ou atresícos, onde foram agrupados como pré-antrais e antrais, de acordo com a ausência e presença do antro, respectivamente. DRIANCOURT *et al.* (1985) classificaram a população folicular em ovelhas, tendo por base a medida do diâmetro do folículo, em folículos primordiais, aqueles que apresentam um diâmetro menor que 60 μm e folículos pré-ovulatórios com diâmetro de 3 mm ou 5 mm. Já HULSHOF *et al.* (1994) classificaram os folículos pré-antrais de acordo com seu diâmetro: primordiais (30 a 40 μm); primários (40 a 60 μm) e secundários (> 60 μm).

Além do método de classificação através do tamanho do folículo, HULSHOF *et al.* (*op. cit.*) e PERRIN & DONOVAN (1984) classificaram os folículos pré-antrais em categorias foliculares, com base no grau de evolução: primordiais, onde o oócito está cercado por uma única camada de células da granulosa de forma achatada; b) primários, o oócito está

circundado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica e c) secundários, onde o oócito está circundado por duas ou mais camadas de células de forma cúbicas. Utilizando o mesmo método de classificação ERICKSON (1966b) classificou os folículos ovarianos bovinos em:

- a) primordial, onde o oócito está circundado por uma única camada de células foliculares;
- b) crescimento, onde o oócito está envolto por duas ou mais camadas de células foliculares;
- c) vesiculares, onde o folículo apresenta-se com uma cavidade completamente formada, isto é, o antro.

CAHILL *et al.* (1979) classificaram a população folicular em:

- a) folículos pequenos, os folículos que apresentam duas ou menos camadas de células da granulosa;
- b) folículos grandes, que apresentam três ou mais camadas de células da granulosa;
- c) folículos pré-ovulatórios os que apresentam células dispersas ao redor do oócito.

Combinando as classificações de ERICKSON (1966b) CAHILL *et al.* (1979) e HULSHOF *et al.* (1994b), os folículos primordiais, primários e secundários foram colocados na categoria de folículos pré-antrais ou não cavitários. Já os folículos vesiculares e pré-ovulatório foram incluídos na categoria dos folículos antrais. Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular e são os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais do ovário (SAUMANDE, 1991).

Os folículos primordiais apresentam células de forma achatada, demarcada por uma membrana basal que os separa do estroma ovariano (HIRSHFIELD, 1991; HULSHOF *et al.* 1994; PERRIN & DONOVAN 1984; GORDON, 1995b) e estão localizados na região periférica do córtex ovariano, ocupando uma zona imediatamente abaixo da túnica albugínea (HARRISON *et al.* 1972; GREENWALDE & MOOR, 1989). Em bovinos (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), em humanos (GOUGEON & CHAINY, 1987), cetáceos odontoceto, *Tursiops truncatus* (HARRISON *et al.* 1972) e para a espécie *Globicephala macrorhynchus* (MARSH & KASUYA, 1984) o diâmetro dos folículos primordiais é de 35,23 µm, 30 µm a 42,5 µm, 50 µm e 58 µm, respectivamente.

Na espécie bovina (BECKERS *et al.*, 1996) observaram folículos primários que apresentavam um diâmetro médio de 40 a 60 µm. Quanto aos folículos secundários, onde, nos

estágios mais avançados podem ser visualizadas as células da teca e a zona pelúcida entre o oócito e as camadas de células da granulosa (VAN DEN HURK *et al.*, 1997; FIGUEIREDO, 1995a), o diâmetro dos folículos em bovinos (BECKERS *et al.*, 1996), humanos (GOUGEON & CHAINY, 1987) e para a espécie de cetáceo *Phocena phocoena*, GASKIN, *et al.* (1984) foram 60 μm , 50 μm a 90 μm e 1 a 6 mm, respectivamente.

Com o aumento das células da granulosa, há um aumento na produção e acumulação de fluido, conduzindo ao desenvolvimento da cavidade folicular ou antro e com células próximas ao estágio final de diferenciação (PERRIN & DONOVAN, 1984; HIRSHFIELD, 1988) originando os folículos antrais (terciários e de De Graaf).

O aparecimento do antro em ovelhas foi observado por DUFOUR e GUILBAULT (1984) em folículos medindo 0,21 mm. Segundo FORTUNE (1994), a formação do antro, em alguns mamíferos como mulher, vaca e rata, ocorre em folículos de 0,2 a 0,4 mm. Para a espécie bovina (vaca), LUSSIER *et al.* (1987) observaram que a formação da cavidade antral em folículos ocorreu entre 0,14 a 0,28 mm.

O folículo terciário é caracterizado pela presença da zona pelúcida cercado o oócito, várias camadas de células da granulosa, membrana basal, teca interna e externa e uma pequena cavidade antral (GORDON, 1994). Em *Globicephala macrorhynchus*, foi observado um diâmetro médio de 150 a 200 μm em pequenos folículos antrais MARSH & KASUYA, (1984).

Os folículos de De Graaf ou pré-ovulatórios são caracterizados por representarem o estágio final do desenvolvimento folicular. Em caprinos GUNTHER & KOT (1994) observaram folículos de De Graaf com 6 mm de diâmetro e em bovinos folículos com 18 mm. FORTUNE (1994) observou folículos em ratas e mulheres alcançando 1 mm e 20 mm de diâmetro, respectivamente. Em *Pontoporia blainvillei*, CLAVER *et al.*, (1994) observaram um tamanho máximo de 7 mm. Já para *G. macrorhynchus*, a maioria dos folículos antrais chegam até 1 cm (COLLET, 1990).

3.7 População Folicular

A população folicular presente no ovário pode ser estimada através de estudos histológicos do ovário, como é empregado por vários autores (ERICKSON, 1966b, LAND, 1970; CAHILL *et al.*, 1979; GOUGEON & CHAINY, 1987; KORING *et al.*, 1991; MCDUGALL *et al.*, 1997; AMORIM, 1998; LUCCI *et al.*, 1999). A contagem geralmente

é feita observando-se o núcleo visível do oócito nas secções histológicas (ABERCROMBIE, 1946), evitando a sub ou superestimativa da população folicular. Alguns autores como DRIANCOURT *et al.* (1985) e GOUGEON & CHAINY (1987) fazem uso de fatores de correção, considerando o diâmetro médio do oócito, a espessura da secção, o número total de secções e o número de secções observadas, uma vez que nem todas as seccões histológicas são analisadas.

A contagem de uma a cada 120 secções, como procedimento para a estimativa da população de folículos pré-antrais foi adotada por CAHILL *et al.* (1979) e DRIANCOURT *et al.* (1985). ERICKSON (1966b) estimou a população folicular, pela contagem de uma a cada 20 secções histológicas. Já LAND (1970) estimou a população folicular pela contagem do núcleo do oócito a cada 10 secções histológicas das 50 primeiras e últimas secções. No meio do ovário, o autor utilizou uma a cada 14 secções. KORING *et al.* (1991) utilizou-se da contagem de 3 secções histológicas equidistantes para estimar a população de folículos primordiais. Tais métodos são desenvolvidos e aplicados principalmente de acordo com a espécie animal e as classes de folículos a serem estimadas.

Existe uma grande variação individual no número de folículos presentes no ovário de mamíferos (CAHILL *et al.*, 1979; BETTERIDGE *et al.*, 1989). DRIANCOURT *et al.* (1985), observaram que existe em média, de 15.830 e 2.486 folículos pré-antrais por ovário em ovelhas da raça Booroola com idades de 2 e 8 anos respectivamente, e de 27.097 e 10.974 folículos para a raça Merino de 2 e 8 anos de idade, respectivamente. CAHILL *et al.* (1979), obtiveram uma média respectivamente, de 30.501 e 56.236 folículos pré-antrais por ovário para as raças Romanov e Ile-de France. LAND (1970), estudando ovários de ovelhas recém nascidas, estimou a população folicular em ovelhas da raça Blackface em 99.460 folículos, e em 81.030 para a raça Welsh. Estudos da população folicular em bovinos foram realizados por ERICKSON (1966b) que obteve 156.053 folículos pré-antrais em ovários de animais recém nascidos (1-14 dias) e 3.072 folículos em ovários de animais adultos (15-20 anos). O mesmo autor observou folículos primordiais com uma média de 133.000 até o 4º ano de vida, declinando posteriormente até próximo a zero nos animais com 15-20 anos. Trabalhando com vacas férteis e inférteis, ERICKSON *et al.* (1976), obtiveram respectivamente, um número médio de 25.268 e 23.204 folículos pré-antrais. Para primatas (não humanos), KOERING *et al.* (1991) estimaram a população de folículos primordiais, em um número médio de 227.370 folículos por ovário.

A população folicular, ao nascimento, foi estimada ser em média 235.000 folículos na vaca (BETTERIDGE *et al.*, 1989), 160.000 na ovelha (DRIANCOURT *et al.*, 1991) e 200.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986).

Além da marcante variação individual e dos fatores citados acima como raça, espécie (CAHILL *et al.*, 1979) e idade (ERICKSON, 1966b; PETERS, 1976; RUSSE, 1983; GOUGEON & CHAINY, 1987; MONNIAUX *et al.*, 1994) outros fatores como níveis hormonais (PETERS, 1976), genética (SMITH *et al.*, 1994) e estado reprodutivo do animal (ERICKSON *et al.*, 1976), como também o método de estimativa empregado, podem influenciar o número de folículos presentes no ovário.

3.8 Ovulação

Na maioria dos mamíferos, quando o oócito alcança a metáfase da segunda divisão meiótica (oócito secundário), ele é liberado do folículo e do ovário por um processo denominado de ovulação (BAKER, 1982), que ocorre geralmente no polo anterior do ovário (SLIJPER, 1966).

Em relação ao ciclo reprodutivo, a ovulação varia consideravelmente entre espécies, podendo ser induzida, através da cópula e/ou da presença de um macho maturo podendo ser espontânea (BACKER, 1982; PERRIN & REILLY, 1984). Segundo SLIJPER (1966) a ovulação em cetáceos é espontânea. Estudos feitos com alguns delphinídeos como *Turciops truncatus* e *Delphinus delphis* (KIRBY & RIDGWAY, 1984; SCHROEDER, 1990), *Globicephala melaena*, *Pseudorca crassidens*, *Stenella spp* e *Lagenorhynchus obliquidens* (HARRISON, 1969, HARRISON *et al.*, 1972) comprovam esta afirmação.

Logo após a ovulação, a taxa de crescimento do folículo de De Graaf torna-se muito alta (IVASHIN, 1984) acarretando mudanças no folículo. Há a formação de uma glândula endócrina dentro do córtex ovariano, denominada de corpo lúteo (CL), cuja função é secretar hormônios esteróides e progesterona que controlam a duração do ciclo reprodutivo e mantém a gestação (BAKER, 1982).

O destino do CL depende do sucesso ou do insucesso reprodutivo do indivíduo. Caso a fertilização ocorra, o CL é denominado de CL gravídico, permanecendo ativo por todo o período de gestação (BANKS, 1992). Em cetáceos, a regressão do CL inicia imediatamente após o parto (SLIJPER, 1966). Caso não ocorra a fertilização, o CL formado é denominado de

CL de ovulação. Provavelmente em todos os cetáceos, o CL de ovulação persiste por quinze a vinte dias, sofrendo logo após a regressão (SLIJPER op. cit.).

O final da vida, do CL gravídico ou de ovulação, é marcado pelo encerramento da secreção de progesterona e pela degeneração das células luteínicas. A regressão é concluída pela infiltração de fibroblastos que irão converter a glândula em uma massa de tecido denominado de corpo albicans (CA) (BAKER, 1982).

Existem evidências que o CA em odontocetos, persiste ao longo da vida do animal, assim como nos mysticetos (HARRISON, 1949; SERGEANT, 1962; SLIJPER, 1966; HARRISON, 1969). PERRIN & REILLY (1984) observaram que o CA aparentemente, persiste indefinidamente, em pelo menos algumas espécies como *G. macrorhynchus* e *G. melaena*. Em *Stenella* spp, as fêmeas apresentam os ovários com poucos CAs quando comparadas com outras fêmeas jovens ainda em atividade reprodutiva. Isto indica que alguns CAs podem ser reabsorvidos, ou pelo menos não são detectáveis. Neste sentido, HARRISON *et al.* (1981), observaram que o CA em *Pontoporia blainvilei* persiste por no máximo quatro anos, posteriormente são reabsorvidos por completo.

No entanto, foi observado, que os ovários de algumas espécies de cetáceos apresentam cicatrizes externas oriundas de CAs que persistem por anos (PERRIN & REILLY, 1984). Esta é a melhor evidência externa no ovário, de que o animal tenha ovulado pelo menos uma vez, indicando desse modo a maturidade sexual do animal.

3.9 Atresia Folicular

Ao longo do ciclo de desenvolvimento folicular, ocorre um fenômeno normal, denominado de atresia folicular (PERRIN & DONOVAN, 1984), ou seja, um processo degenerativo fisiológico dos folículos (SAUMANDE, 1981), e cuja duração ainda é desconhecida (INGRAM, 1962).

A atresia pode ocorrer por duas vias: a degenerativa (SAUMANDE, op. cit.) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO *et al.*, 1995a). A degenerativa, caracteriza-se histologicamente, pela presença de corpos picnóticos, desintegração das células da granulosa, associada ou não à condensação e retração da cromatina nuclear do oócito (CAHILL *et al.*, 1979; DRIANCOURT *et al.*, 1985). A via apoptótica é controlada geneticamente, ocorrendo a morte celular em resposta a um controle intrínscio (HUGHES & GOROSPE, 1991).

A atresia dos folículos pode ocorrer a qualquer momento na sua sequência de desenvolvimento (BANKS, 1992) inclusive na fase pré-antral da foliculogênese, não prevalecendo igualmente em todos os estágios (FORTUNE, 1994).

Alguns autores relatam que a atresia afeta principalmente os folículos antrais, especialmente quando estes atingem o tamanho em que ocorre a diferenciação terminal das células da granulosa e da teca (SAUMANDE, 1981; LUSSIER *et al.*, 1987; HIRSHFIELD, 1988). A atresia durante esse estágio de desenvolvimento parece ser um componente regulatório do número de folículos selecionados para a ovulação (HIRSHFIELD, 1988).

De acordo com HIRSHFIELD (*op. cit.*) os folículos se tornam atrésicos porque seu estágio de desenvolvimento está fora de sintonia com os eventos normais do ciclo estral. Para INGRAM (1962) vários fatores como idade, ciclo reprodutivo, gestação, lactação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, hormônios, nutrição e isquemia podem influenciar o processo de atresia.

Apesar de ser um fenômeno natural, a atresia é responsável pela perda da quase totalidade (99,9%) dos folículos presentes no ovário (ERICKSON, 1986), reduzindo de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, acarretando na redução da produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva da fêmea (FIGUEIREDO *et al.*, 1995a).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo de determinação de idade e da população folicular, foram utilizados dez exemplares fêmeas da espécie *Sotalia fluviatilis*, encontrados encalhados e/ou capturados acidentalmente em redes de pesca na costa do Ceará (Figura 2 e Tabela 1).

Figura 2 - Exemplar de *Sotalia fluviatilis*, encalhado no Litoral do Ceará.



Fonte: Foto tirada por Andréa Pighinelli Cavallante

Tabela 1 - Dados referentes aos exemplares da espécie *Sotalia fluviatilis*, utilizados no presente estudo.

EXEMPLAR	LOCAL DA COLETA	COMPRIMENTO (cm)
A	Taíba	128
B	Taíba	95
C	Porto do Mucuripe	102
D	Icaraí	184
E	Praia dos Diários	181
F	Porto do Mucuripe	135
G	Praia do Meireles	185
H	Praia Mansa	166
I	Taíba	190
J	Beira Mar	156

Fonte: Elaborada pela autora

Todos os animais foram medidos morfometricamente, conforme a descrição de NORRIS (1961), sexados e posteriormente necropsiados para a colheita das gônadas e dentes.

4.1 Determinação da Idade

4.1.1 Preservação e Análise dos Dentes

Os dentes foram preparados, através do método de secção fina de dente descalcificado e corado. As lâminas preparadas foram levadas posteriormente para análise em microscopia óptica, para determinação da idade, seguindo as recomendações de HOHN *et al.* (1989) e PERRIN & MYRICK (1980). O método baseia-se na leitura de bandas translúcidas e opacas, que refletem os períodos anuais de crescimento. De acordo com HUI (1980a), não há diferença no padrão de deposição de Grupos de Camadas de Crescimento (Growth Layer Group – GLG) entre os ramos mandibulares superiores ou inferiores, esquerdo ou direito. Portanto, para determinação da idade foram utilizados dentes com menos desgastes e menor curvatura, retirados da porção central da mandíbula ou maxila dos animais necropsiados. Os dentes foram fixados em formol à 10%, conservados em glicerina e álcool (1:1), e descalcificados em RDO (descalcificador ósseo comercial). O término da descalcificação foi

definido pela transparência e flexibilidade do dente. Após a descalcificação, os dentes foram lavados por aproximadamente 12 horas em água corrente e seccionados longitudinalmente em micrótomo de congelamento de criostato no Laboratório de Biologia tecidual (LBCT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Foram realizados cortes longitudinais, em posição labio-lingual, de 40 μ m de espessura, sendo selecionados os cortes sagitais e parassagitais. As secções foram coradas com hematoxilina de Mayer por 40 minutos e montadas em glicerina 100%. Todas as lâminas foram fotomicrografadas.

A contagem das camadas de crescimento (GLG) foram feitas utilizando microscópio óptico e lupa binocular com aumento variando respectivamente de 25 a 50 e 16 a 50 vezes, ambos com luz transmitida. Foram realizadas duas séries de leituras sem referência a dados métricos e biológicos dos animais, para não tendenciar a análise das amostras. Uma terceira leitura foi realizada utilizando as microfotografias onde todas as camadas anuais foram marcadas. A leitura da idade foi realizada através da contagem de GLG na dentina. A contagem da GLG no cimento foi realizada apenas para confirmação nos casos de dúvidas na contagem das camadas da dentina. As idades dos animais foram estimadas assumindo-se que cada GLG representa um ano, conforme critérios previamente adotado por RAMOS (1997) e PINEDO & HOHN (2000). Apenas a última camada completa foi considerada para a determinação de idade na espécie, evitando-se, assim, a contagem de frações de camadas.

4.2 Estudo da População Folicular

4.2.1 Preservação e Análise dos Ovários

Imediatamente após a colheita, os ovários foram fixados em solução formol 10% durante 48 horas, e conservados posteriormente, em álcool 70%. A desidratação foi realizada em séries crescentes de etanol. A seguir as amostras foram diafanizadas e inclusas em parafina. Os cortes histológicos, foram realizados com espessura de 7 μ m, sendo posteriormente corados com PAS hematoxilina.

Antes de iniciar o processamento histológico, todos os ovários foram analisados macroscopicamente, registrando-se sua posição anatômica (ovário direito e esquerdo), o peso (g) e a presença ou não de cicatrizes ovarianas externas, corpo lúteo (CL) e corpo albicans (CA).

Para o estabelecimento do estado de maturação sexual, foi adotado o critério de presença de pelo menos um CL ou CA na superfície de um dos ovários. Foram consideradas imaturas aquelas fêmeas que não apresentavam cicatrizes ovarianas, e maduras aquelas que apresentavam pelo menos uma cicatriz ovariana, já que estas são permanentes em *Sotalia fluviatilis* (PERRIN & DONOVAN, 1984).

Para a estimativa da população folicular foram contados somente os folículos cujos núcleos oocitários eram claramente visíveis a cada 120 secções (CAHILL *et al.*, 1979). O número total de folículos por ovário foi estimado utilizando a metodologia estereológica “fractionator” segundo GUNDERSEN *et al.* (1988), de acordo com a fórmula abaixo:

$$N = Q \times f$$

Onde:

N = população folicular estimada

Q = Número de folículos pré-antrais observados na amostra

f = Fração da amostra

4.3 - Análise Estatística

4.3.1 Comparação entre Médias

4.3.1.1 Estudo da População Folicular

Os dados referentes a população folicular pré-antral nos ovários de *S. fluviatilis* na costa do Ceará, foram testados *a priori* em relação a sua normalidade, para a aplicação da estatística paramétrica, em especial o teste t, para a comparação das médias em função das diferentes dimensões de interesse neste trabalho. Para tanto, foram utilizados os procedimentos de Shapiro-Wilks e Kolmogorov-Smirnov (ZAR, 1984). As estatísticas não foram significativas (W-P=0,34, K-S=P>0,26) indicando que as populações não apresentam desvios consideráveis da normalidade.

Para todas as análises estatísticas e elaboração de gráficos, utilizou-se o SPSS for windows (Statistical Package for the Social Science), aplicativo desenvolvido pela Norussis/INC e o Microsoft Excel.

4.3.1.1.1 Variações na População Folicular em Relação ao Estágio de Maturação sexual

Para estudar as variações na população folicular pré-antral nos ovários de *Sotalia fluviatilis* em função do estágio de maturação das fêmeas, foi testada a seguinte hipótese:

- a) H_0 : Não há diferença na população folicular em relação ao estágio de maturação sexual;
- b) H_A : Há diferença na população folicular em relação ao estágio de maturação sexual.

O estudo foi efetuado separadamente para cada lado do ovário, utilizando-se o teste-t para a comparação de médias independentes. Para cada caso, foi aplicado o teste de Levene para verificar a igualdade ou não de variâncias. No entanto, numerosos estudos indicam que o teste-t é robusto o suficiente para suportar desvios relativos às suas premissas teóricas, especialmente quando o tamanho amostral é comparativamente próximo (ZAR, 1996).

4.3.1.1.2 Variações na População Folicular em Relação ao Lado do Ovário

Visando identificar diferenças funcionais em relação ao lado ovariano foi testada a seguinte hipótese, considerando-se a população total de fêmeas analisadas, bem como as fêmeas imaturas e maduras separadamente:

- a) H_0 : Não existe diferença na população folicular entre ovário direito e esquerdo em um mesmo animal.
- b) H_A : Existe diferença na população folicular entre o ovário direito e esquerdo em um mesmo animal.

Para tanto utilizou-se teste-t de Student pareado, o qual é aplicado em situações em que as observações oriundas de duas amostras diferentes são correlacionadas de alguma

forma entre si (ZAR, 1996. SOKAL & ROHLF, 1981). Neste caso, consideram-se as amostras correlacionadas, os ovários direito e esquerdo retirados de um mesmo animal.

4.3.1.2 Variações no Estudo do Peso do Ovário em Relação ao Lado Ovariano

Para se avaliar a diferença de peso entre o ovário do lado direito e esquerdo foi testada a seguinte hipótese, considerando-se animais imaturos e maturos separadamente:

- a) H_0 : Não existe diferença no peso ovariano entre o lado direito e esquerdo de um mesmo animal;
- b) H_A : Existe diferença no peso ovariano entre o lado direito e esquerdo de um mesmo animal.

Foi utilizada a estatística t de Student para pares de amostras, corrigindo-se desta forma, para os efeitos decorrentes da comparação entre ovários provenientes de um mesmo animal (ZAR, 1996; SOKAL & ROHLF, 1981).

4.3.2 Relação entre Variáveis

Utilizou-se o método da regressão linear, para estudar o comportamento da população folicular pré-antral em função da idade dos indivíduos e do peso ovariano, assim como entre o peso do ovário e a idade das fêmeas. O método de regressão linear, tem como finalidade representar a relação funcional existente entre duas variáveis (dependentes e independentes) de uma população, de maneira que, esta relação possa ser explicada através de uma função linear que venha a traduzir as possíveis relações de causa/efeito existente entre as variáveis estudadas (DRAPER & SMITH, 1981).

Foram consideradas hipóteses de interesse:

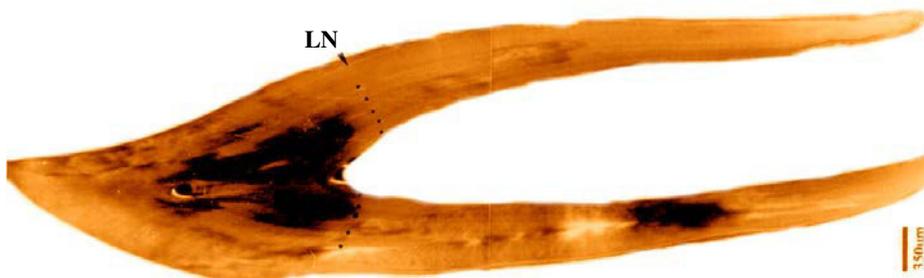
- a) H_{o1} : O número de folículos não está relacionado à idade do animal;
- b) H_{A1} : O número de folículos está relacionado à idade do animal;
- c) H_{o2} : O número de folículos não está relacionado ao peso do ovário;
- d) H_{A2} : O número de folículos está relacionado ao peso do ovário;
- e) H_{o3} : O peso do ovário não está relacionado a idade do indivíduo;
- f) H_{A3} : O peso do ovário está relacionado a idade do indivíduo.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da Idade

A dentina pré-natal apresentou uma camada uniforme moderadamente corada enquanto que a linha neonatal, mostrou-se com uma camada fina e sem coloração fortemente marcada. Na dentina pós-natal, cada grupo de camada de crescimento (Growth Layer Group, GLG) foi constituída de uma camada estreita clara (não corada) e uma camada larga escura (corada). A camada não corada da GLG subsequente, foi delimitada por uma fina camada fortemente corada da camada precedente. A primeira e a segunda camadas de crescimento apresentaram espessura similar a dentina pré-natal, ocorrendo um decréscimo gradual na espessura das camadas subsequentes, proporcional ao número de camadas existentes (Figura 3).

Figura 3 - Secção longitudinal do dente de *Sotalia fluviatilis*, indicando a posição da linha neonatal (LN) e as camadas de crescimento GLG.



Fonte: Própria autora

Os exemplares mais velhos (E, G e I) não descalcificaram por completo, afetando a qualidade dos cortes histológicos. Desta forma, os resultados obtidos foram considerados como idades aproximadas para estes (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados referentes à idade (anos) dos exemplares da espécie *Sotalia fluviatilis*, estimada com base nas Growth Layer Groups (GLGs).

Exemplares (<i>S. fluviatilis</i>)	Idade (GLGs)
A	1
B	0
C	0
D	9
E	23
F	1
G	19
H	6
I	22
J	5

Fonte: Própria autora

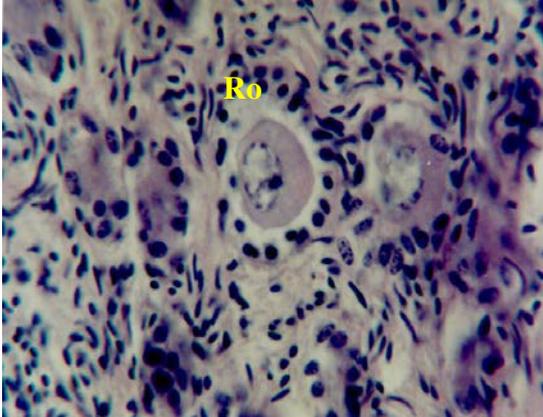
5.2 Estudo da População Folicular

5.2.1. Aspectos Histológicos

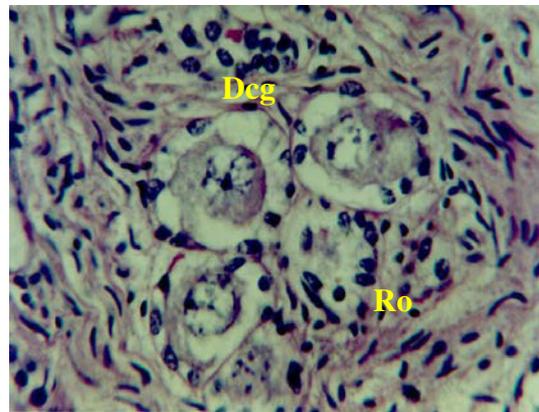
Foram analisados os folículos pré-antrais de 10 exemplares de *S. fluviatilis*, apresentando-se todos em estado de degeneração. O desenvolvimento folicular foi observado da periferia em direção às camadas mais profundas da cortical. A degeneração folicular foi caracterizada, na maioria dos casos, pela retração do oócito (Figura 4a), desorganização e picnose das células da granulosa, associada a retração oocitária (Figura 4b), aumento de tamanho e picnose das células da granulosa (Figura 4.1c e d).

Figura 4 - Folículos degenerados: a) retração do oócito (Ro) e b) retração do oócito (Ro) e desorganização das células da granulosa (Dcg).

a)



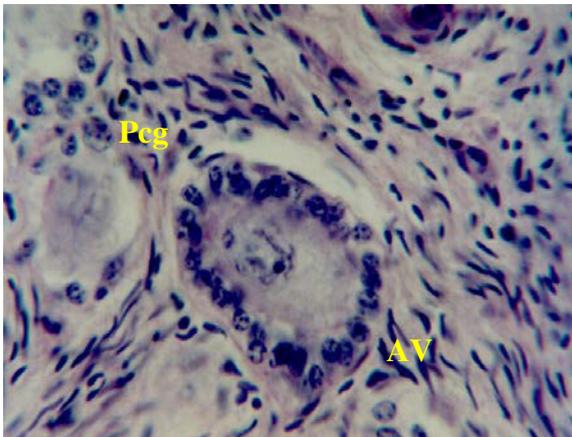
b)



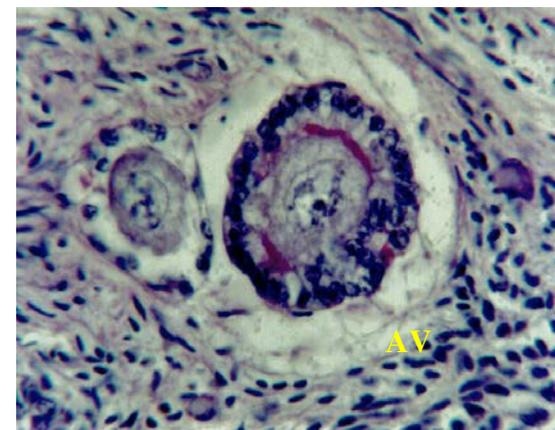
Fonte: Própria autora

Figura 4.1 - Folículos degenerados: c) picnose da célula da granulosa (Pcg) e aumento de volume (AV); d) aumento de volume da célula da granulosa (AV).

c)



d)



Fonte: Própria autora

5.2.2 Caracterização do Estágio de Maturação Sexual

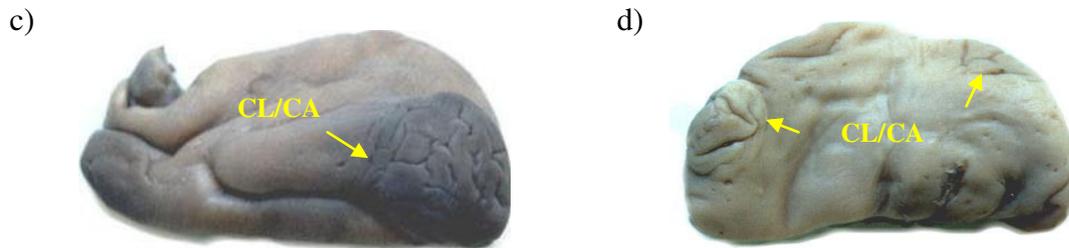
Foram observadas cicatrizes externas (CL/CAs) em alguns exemplares de *Sotalia fluviatilis* (Figura 5, 5.1) indicando desse modo a aturidade sexual dos exemplares (Tabela 3).

Figura 5 - Cicatrizes ovulatórias, encontradas nos exemplares g (a) (b).



Fonte: Própria autora

Figura 5.1 - Cicatrizes ovulatórias, encontradas nos exemplares d (c) e e (d).



Fonte: Própria autora

Tabela 3 - Classificação das fêmeas de *Sotalia fluviatilis* recuperadas na costa do Ceará, quanto ao estágio de maturação sexual.

EXEMPLAR	PRESENÇA DE CICATRIZ	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO
A	Ausência	Imaturo
B	Ausência	Imaturo
C	Ausência	Imaturo
D	Presença	Maturo
E	Presença	Maturo
F	Ausência	Imaturo
G	Presença	Maturo
H	Ausência	Imaturo
I	Presença	Maturo
J	Ausência	Imaturo

Fonte: Própria autora.

As análises macroscópicas dos ovários mostraram uma idade de maturação sexual estimada em 9 anos (exemplar D). A ausência de animais entre 7 e 8 anos, e o pequeno número amostral impossibilitou a estimativa da idade de maturação sexual com acuidade. No entanto, nenhuma fêmea com idade até 6 anos estava madura, e todas com idade igual ou superior a 9 anos estavam sexualmente maduras, sugerindo que a maturação sexual em fêmeas de *Sotalia fluviatilis* possa ocorrer no intervalo de 6 a 8 anos de idade.

5.2.3 Variações na população folicular pré-antral em relação ao estágio de maturação sexual.

As diferenças entre as médias populacionais de indivíduos imaturos e maduros foram altamente significativas e significativas para o ovário esquerdo e direito respectivamente. A média de folículos no ovário esquerdo dos animais imaturos foi igual a 1.162.460 folículos, enquanto que os exemplares maduros apresentam em média 66.270 folículos (Tabela 4, Figura 6). Já no ovário direito, as médias observadas seguiram o mesmo padrão apresentando valores iguais a 975.500 e 51.630 para animais imaturos e maduros respectivamente (Tabela 4, Figura 6.1).

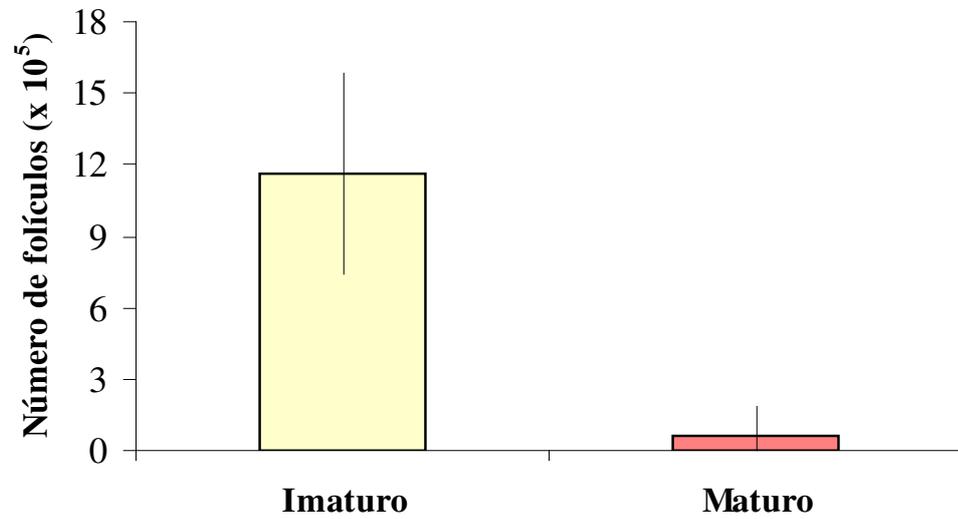
Tabela 4 - Tamanho da amostra (n), médias e intervalos de confiança e teste-t comparando-se as populações de folículos pré-antrais em relação ao estágio de maturação sexual das fêmeas e o lado do ovário.

Ovário	Estágio de Maturação	n	Média	LC 95%	t	gl	p	
Direito	Imaturo	6	975.500	143088	520111	4,14	8	0,03*
	Maturo	4	51630	159070	- 55810			
Esquerdo	Imaturo	6	1.162.460	1586386	38533	5,27	8	0,00*
	Maturo	4	666.270	182199	- 49659			

* Significativo

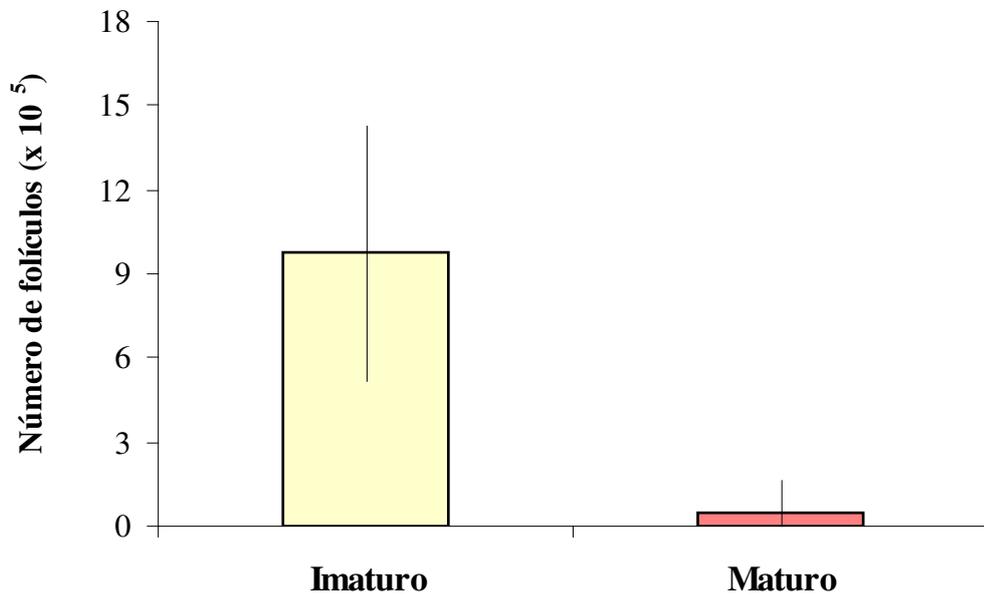
** Altamente

Figura 6 - Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, no ovário esquerdo de exemplares imaturos e maduros de *Sotalia fluviatilis* da costa do Ceará.



Fonte: Própria autora.

Figura 6.1 - Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, no ovário direito de exemplares imaturos e maduros de *Sotalia fluviatilis* da costa do Ceará.



Fonte: Própria autora.

5.2.4 Variação na População Folicular em Relação ao Lado do Ovário

Considerando-se o total de fêmeas analisadas, foram observadas diferenças significativas entre as populações foliculares do ovário direito e esquerdo (Tabela 5). A média da população folicular pré-antral estimada para o ovário direito foi 605.952 (Tabela 5), enquanto que os valores máximos e mínimos observados foram 1.705.680 e 7.320 folículos pré-antrais, encontrados nos exemplares J e I respectivamente. No ovário esquerdo, a população folicular foi, em média, sempre maior, quando comparada com a população do ovário direito, tendo como exceção o exemplar B. A média da população folicular estimada para o ovário esquerdo foi 723.984 (Tabela 5), tendo os valores máximos e mínimos 1.927.800 e 12.600 folículos respectivamente, ambos encontrados também nas fêmeas J e I.

A figura 7 apresenta as médias e intervalos de confiança das populações foliculares por lado do ovário. Observa-se que os intervalos de confiança são de grande amplitude, indicando uma grande variabilidade nos dados, apesar dos resultados significativos da análise estatística.

Tabela 5 - Correlação entre os pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se as populações de folículos pré-antrais em relação ao lado do ovário.

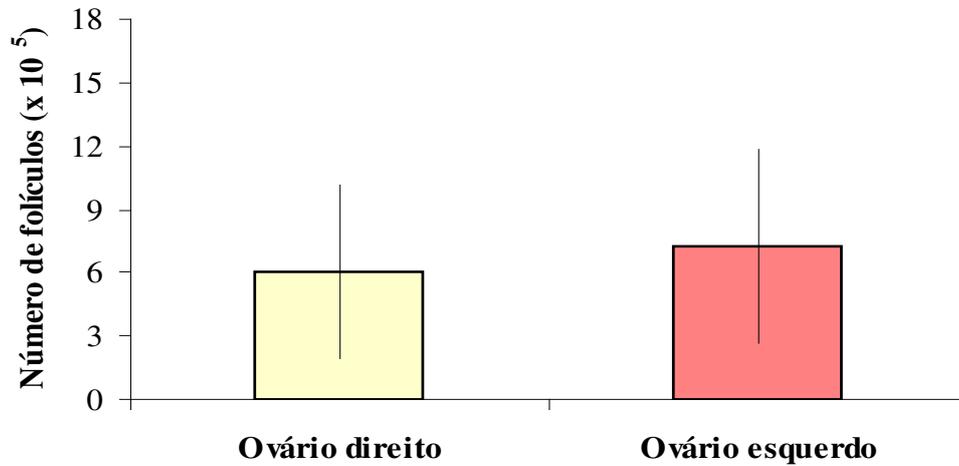
População folicular pré-antral estimada	Pares	Correlação	P	Média	95% CL	
Ovário direito	10	0,98	0,00**	605.952	192.709	1.019.195
Ovário esquerdo				723.984	264.353	1.183.615
Diferenças dos Pares						
Média	DP	T	GL	P		
- 118.032	141.152	- 2,30	9	0,02*		

* valores significativos

** valores altamente significativos.

Fonte: Própria autora.

Figura 7 - Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários direito e esquerdo, de exemplares de *Sotalia fluviatilis* da costa do Ceará.



Fonte: Própria autora.

Comparando-se as populações foliculares antrais por lado ovariano para as fêmeas imaturas, verificou-se diferenças estatisticamente significativas, com médias ligeiramente maiores no ovário esquerdo (tabela 6, Figura 8). A média da população folicular pré-antral no ovário direito dos exemplares imaturos foi de 975.500 folículos, e os valores máximos e mínimos foram iguais a 1.705.680 e 587.760, encontrados nos exemplares J e A respectivamente. Já no ovário esquerdo, a média foi de 1.162.460, apresentando valores máximos e mínimos iguais a 1.927.800 e 796.200, encontrados nos exemplares J e F respectivamente. Novamente observa-se intervalos de confiança de grande amplitude indicando uma variabilidade dos dados (Figura 8).

De acordo com o teste-t pareado os ovários mostraram-se altamente correlacionados entre si. A análise comparativa das médias das populações foliculares, mostrou uma diferença significativa entre o número de folículos, por lado do ovário nos exemplares imaturos (Tabela 6).

Observa-se na figura 8 que os intervalos de confiança são de grande amplitude, indicando uma variabilidade considerável dos dados. No entanto, a população folicular no ovário esquerdo foi em média maior.

Tabela 6 - Correlação entre pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se as populações de folículos pré-antrais em relação ao lado do ovário para as fêmeas imaturas.

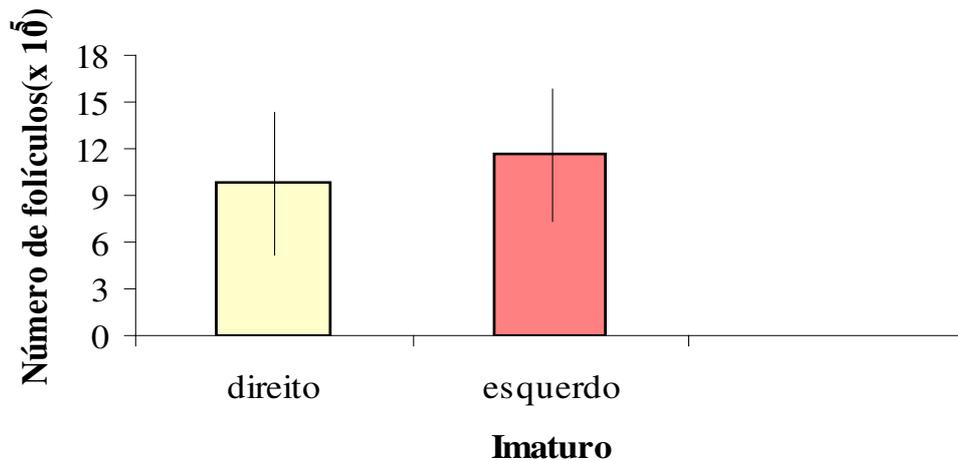
População folicular pré-antral estimada	Pares	Correlação	P	Média	95% CL
Ovário direito	6	0,94	0,00**	975.500	520.186
Ovário esquerdo				1.162.460	738.602
Diferenças dos Pares					
Média	DP	T	GL	P	
186960	146.635	3,12	5	0,02*	

* valores significativos

** valores altamente significativos.

Fonte: Própria autora.

Figura 8 - Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários direito e esquerdo, de exemplares imaturos de *Sotalia fluviatilis* da costa do Ceará.



Fonte: Própria autora.

Os resultados da comparação do número de folículos pré-antrais por lado do ovário entre os exemplares maduros, não foram significativos, indicando que, para as fêmeas maduras analisadas não foi possível detectar diferenças entre o número de folículos pré-antrais nos ovários direito e esquerdo (Tabela 7). Esta incapacidade de detectar diferenças significativas pode estar associada ao número reduzido de amostras disponíveis para o estudo, já que, a média de folículos no ovário esquerdo foi ligeiramente superior a média no ovário

direito (Tabela 7, Figura 9). A média da população folicular pré-antral no ovário esquerdo dos exemplares maduros foi igual a 66.270, enquanto que no ovário direito a média permaneceu em 51.630 folículos. Para ambos os lados dos ovários os valores máximos e mínimos foram observados nos exemplares D e I respectivamente, tendo como valores 152.280 e 7.320 no lado direito, e 172.440 e 12.600 no lado esquerdo respectivamente.

Tabela 7 - Correlação entre pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se as populações de folículos pré-antrais em relação ao lado do ovário para fêmeas maduras.

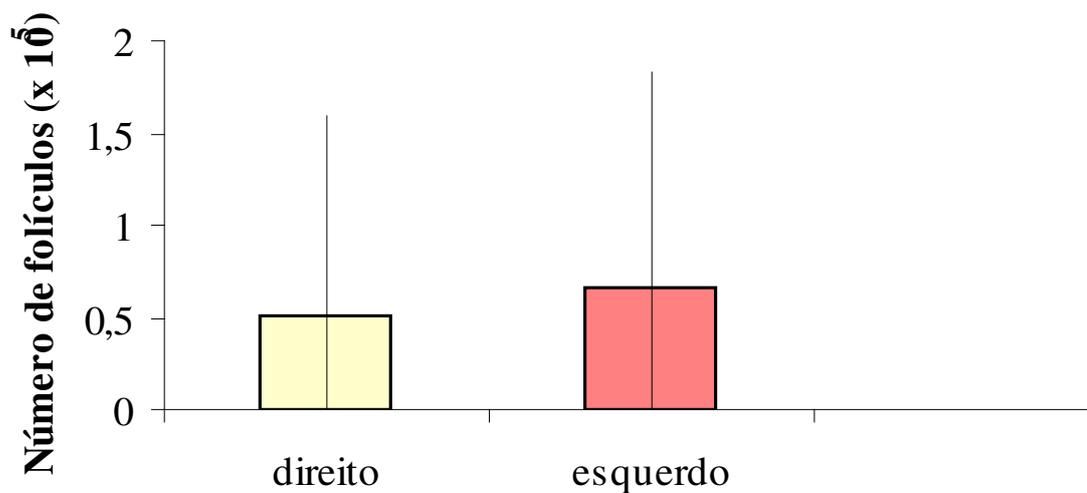
População folicular pré-antral estimada	Pares	Correlação	P	Média	95% CL	
Ovário direito	4	0,98	0,01*	51.630	- 55.826	159.086
Ovário esquerdo				66.270	- 49.676	182.216
Diferenças dos Pares						
Média	DP	T	GL	P		
- 14.640	13.418	- 2,18	3	0,39 ns		

* valores significativos

ns: valores não significativos.

Fonte: Própria autora.

Figura 9 - Médias e intervalos de confiança (95%) das populações foliculares pré-antrais, nos ovários direito e esquerdo, de exemplares maduros de *Sotalia fluviatilis* da costa do Ceará.



Fonte: Própria autora.

5.2.5 Variações no Peso do Ovário em Relação ao Lado Ovariano

A análise comparativa entre as médias do peso dos ovários em relação a sua posição no animal (lado direito ou esquerdo) foi significativa, tanto para fêmeas imaturas quanto maduras (Tabela 8 e 9).

Tabela 8 - Correlação entre pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se os pesos dos ovários (g) em relação a sua posição (lado direito e esquerdo) em fêmeas imaturas.

Peso (g)	Pares	Correlação	P	Média	95% CL	
Ovário direito	6	0,99	0,00**	0,6217	0,3176	0,9258
Ovário esquerdo				0,6017	-49676	182216
Diferenças dos Pares						
Média	DP	T	GL	P		
0,02	0,04	1,15	5	0,30 ns		

** altamente valores significativos

ns: valores não significativos.

Fonte: Própria autora

Tabela 9 - Correlação entre pares de ovários e nível de significância da correlação, médias, intervalos de confiança e teste-t pareado, comparando-se os pesos dos ovários (g) em relação a sua posição (lado direito e esquerdo) em fêmeas maduras.

Peso (g)	Pares	Correlação	P	Média	95% CL	
Ovário direito	4	0,92	0,72*	3,0975	0,8773	5,3177
Ovário esquerdo				4,0525	3,1590	4,9460
Diferenças dos Pares						
Média	DP	T	GL	P		
- 0,95	0,89	- 2,12	3	0,12 ns		

* valores significativos

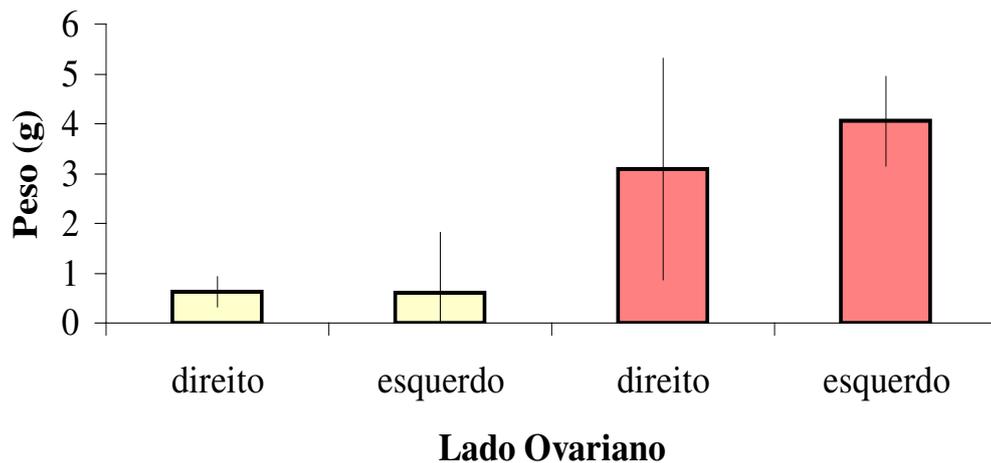
ns: valores não significativos.

Fonte: Própria autora

Comparativamente, o peso médio observado para os ovários de animais maduros foi na ordem de 5,9 vezes maior em relação ao peso dos ovários em animais imaturos (Figura

10) . Apesar das diferenças não serem significativas, o peso médio dos ovários localizados no lado direito dos exemplares imaturos, apresentou-se ligeiramente superior à média do lado esquerdo, tendo como valores 0,6217 e 0,6017, respectivamente. Já, nos animais maduros, esta situação inverte-se e o peso médio dos ovários localizados no lado direito foi maior que no lado esquerdo. As médias para o lado direito e esquerdo foram respectivamente 4,0525 e 3,0975, sendo que este último apresentou a maior amplitude de variação nos valores observados (Tabela 8 e 9, Figura 10).

Figura 10 - Médias e intervalos de confiança (95%) dos pesos dos ovários (g) em relação a sua posição (lado direito e esquerdo) em fêmeas imaturas e maduras de *Sotalia fluviatilis* na costa do Ceará.



Fomte: Própria autora

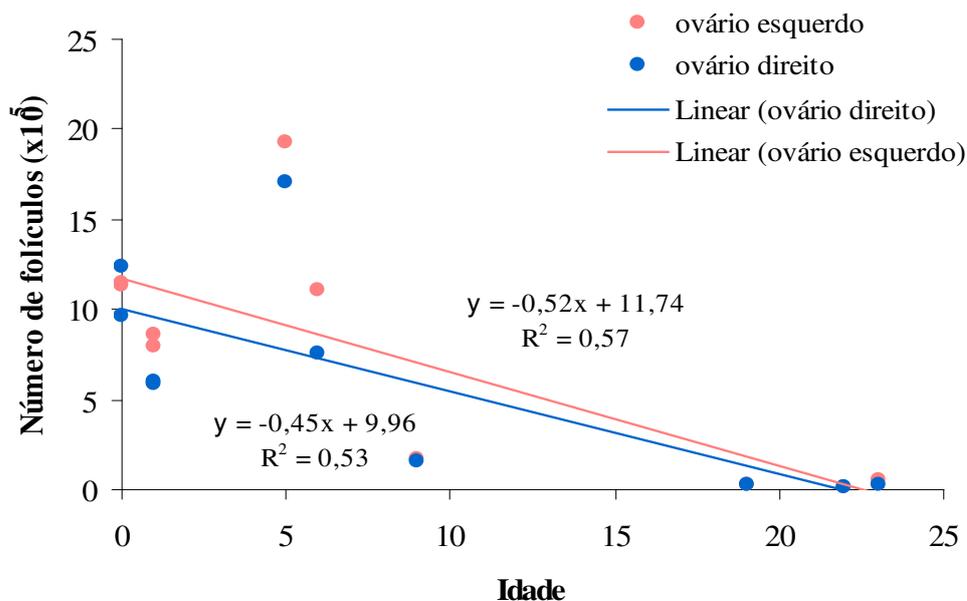
Para ambos os lados do ovário os valores máximos foram encontrados no exemplar H, apresentando para o lado direito o valor de 1,16g e para o lado esquerdo o valor de 1,20g. O valor mínimo para o lado direito foi observado no exemplar C com o peso de 0,42g sendo que para o lado esquerdo, tal peso foi observado no exemplar A, com um valor de 0,37g.

5.2.6 Relação entre Variáveis

5.2.6.1 Número de Folículos em Função da Idade do Animal

Os modelos de regressão linear utilizados para estudar as variações na quantidade de folículos pré-antrais nos ovários, em função da idade dos indivíduos, separadamente por lado ovariano, apresentam coeficientes de correlação iguais a 0,53 e 0,57 para o lado direito e esquerdo respectivamente (figura 11). A quantidade de folículos apresentou uma tendência decrescente com o aumento da idade dos animais, sendo este comportamento evidente para ambos os lados dos ovários, muito embora tenha se observado um menor valor de R^2 para o ovário direito. As relações lineares entre a quantidade de folículos e a idade das fêmeas pode ser descrita pela função $y = (-0,5230x + 11,745) \times 10^5$ para o ovário esquerdo e $y = (-0,454x + 9,9635) \times 10^5$ para o ovário direito

Figura 11 - Relações lineares entre a população folicular pré-antral e a idade das fêmeas, separadas em função do lado ovariano.

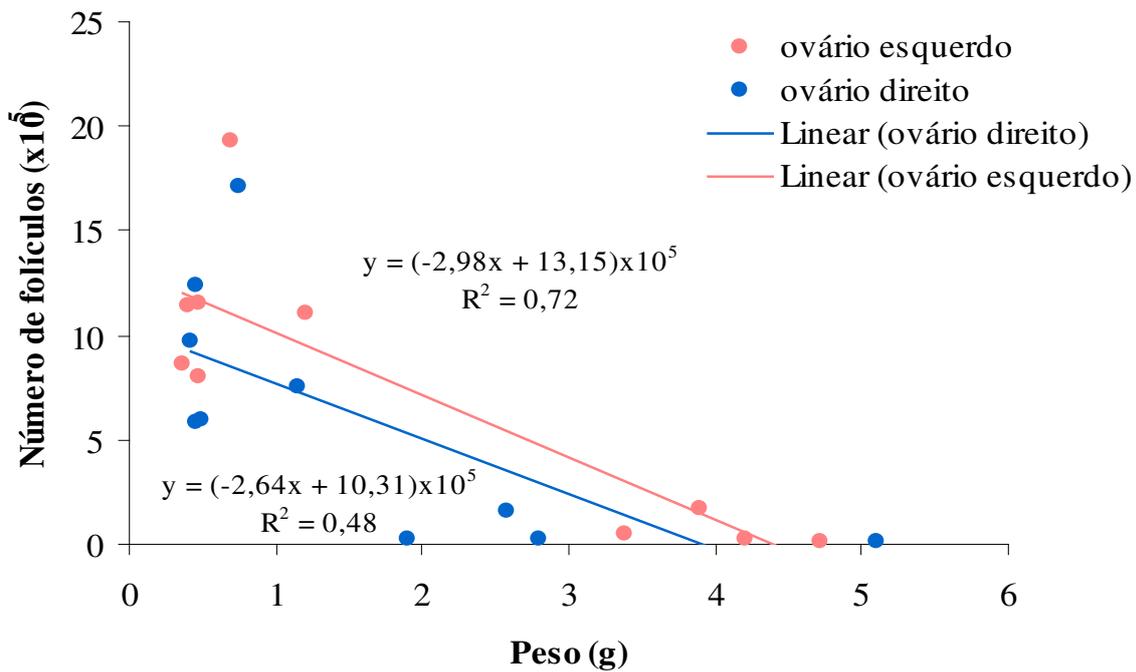


Fonte: Própria autora

5.2.6.2 Número de Folículos em Função do Peso do Ovário

Os modelos de regressão linear utilizados para explicar a variação do número de folículos pré-antrais em função do peso dos ovários, apresentaram coeficientes de correlação iguais a 0,49 e 0,72 para o ovário no lado direito e esquerdo respectivamente. As equações resultantes foram $y = (-2,6399x + 10,315) \times 10^5$ e $y = (-2,9856x + 13,157) \times 10^5$. O número de folículos apresentou uma tendência decrescente com o aumento do peso do ovário, sendo esse, comportamento evidente para ambos os lados do ovário, com um valor de R^2 menor para o ovário direito (Figura 12).

Figura 12 - Relação linear entre a população folicular pré-antral e o peso dos ovários, separados em função do lado ovariano.

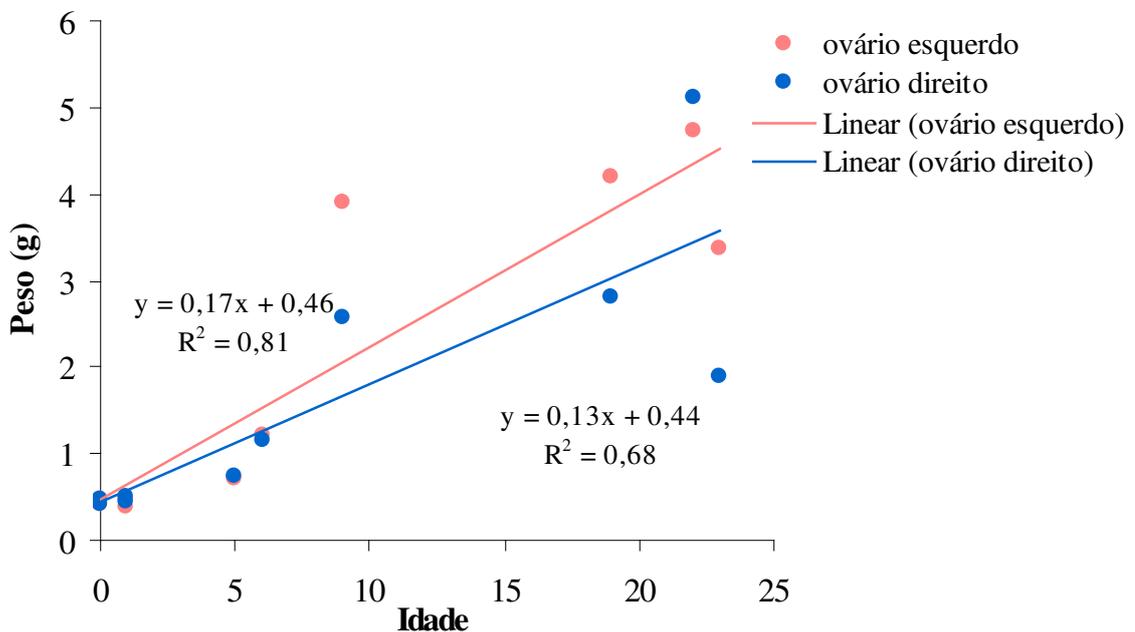


Fonte: Própria autora

5.2.6.3 Peso do Ovário em Função da Idade do Animal

Considerando-se as relações entre o peso dos ovários e a idade dos exemplares, analisados separadamente para cada lado ovariano, resultaram em modelos lineares cujas correlações variam entre 0,68 para o ovário esquerdo e 0,81 para o ovário direito (Figura 13). O peso dos ovários apresentou uma tendência crescente com o aumento da idade dos exemplares, sendo esse comportamento evidente para ambos lados de disposição dos ovários. As equações resultantes foram iguais a $y = 0,1356x + 0,4458$ $R^2 = 0,6826$ para o ovário direito e $y = 0,177x + 0,46$ $R^2 = 0,8121$ para o ovário esquerdo (Figura 13).

Figura 13 - Relações lineares entre o peso dos ovários e a idade das fêmeas, separadas em função do lado ovariano.



Fonte: Própria autora

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, mostraram dados referentes à foliculogênese na espécie de cetáceos *Sotalia fluviatilis*. A localização e o aspecto morfológico dos folículos pré-antrais obedeceram aos critérios previamente descrito por HULSHOF *et al.* (1994a), onde os folículos ovarianos se encontraram na zona periférica da região cortical.

A presença de um grande número de folículos degenerados provavelmente pode ter sido devido ao tempo *pós-mortem* dos exemplares utilizados para o estudo, uma vez que as células sofrem autólise. Somando-se a isso, há o processo natural denominado de atresia, a qual é um processo degenerativo fisiológico dos folículos, podendo ocorrer por duas vias: a degenerativa, caracterizada histologicamente pela presença de corpos picnóticos, desintegração das células da granulosa, associada ou não à condensação e retração da cromatina nuclear do oócito (CAHILL *et al.*, 1979; DRIANCOURT *et al.*, 1985) e a via apoptótica a qual é controlada geneticamente, ocorrendo a morte celular em resposta a um controle intrínseco (HUGHES & GOROSPE, 1991). A análise histológica, neste estudo, mostrou principalmente folículos com retração do oócito, desorganização, picnose e aumento das células da granulosa.

De acordo com WOOD *et al.* (1997), o primeiro indício de degeneração no folículo pré-antral é a degeneração do oócito, seguindo um aumento do volume das células da granulosa, desorganização e baixa densidade celular, mas não havendo corpos picnóticos na célula da granulosa. Segundo (GRIMES *et al.*, 1987; BLONDIN *et al.*, 1986) a picnose das células da granulosa é o primeiro e único indicador de atresia em folículos antrais, já JÓRIO *et al.* (1991), observou que picnose em células da granulosa é quase inexistente em folículos pré-antrais embora seja visto em folículos antrais e torna-se mais frequente com folículos de tamanho aumentado.

No tocante a maturação sexual de *Sotalia fluviatilis*, a inferência de que ocorra entre 6 e 8 anos nos espécimes analisados neste estudo, não difere muito das estimativas realizadas por RAMOS (1997) e ROSAS (2000). Ambos propuseram respectivamente as idades de 6 anos e 7 anos, baseando-se na análise macroscópica do ovário. Este método,

também aplicado neste estudo, é o mais utilizado já que a presença ou ausência de cicatrizes na superfície do ovário é facilmente observada macroscopicamente. Na maioria das espécies de cetáceos os Cas são cicatrizes permanente na superfície dos ovários (OHSUMI, 1964).

Do total de ovários analisados, foi observado que os valores foliculares encontrados em indivíduos imaturos (0 a 6 anos) foi superior àqueles observados em indivíduos maduros (acima de 7 anos), e que o número de folículos diminui com o aumento da idade, concordando com estudos de FIGUEIREDO *et al.* (1993), onde foi observado que o número de folículos pré-antrais varia significativamente conforme o estágio reprodutivo. Estudos histológicos em bovinos descreveram que o número de folículos pré-antrais permaneceu estável até o quarto ou sexto ano de vida, declinando consideravelmente em animais de idade avançada (ERICKSON, 1966b). De um modo geral a população folicular pode ser afetada por diversos fatores, tais como raça (CAHILL & MAULÉON, 1980), idade (ERICKSON 1966ab; MORE, *et al.*, 1974; RUSSE, 1983), níveis hormonais (PETERS, 1976) e estágio reprodutivo (ERICKSON *et al.*, 1976). Em *S. fluviatilis*, no Ceará, observou-se que pelo menos a idade e o estágio reprodutivo afetam a população folicular.

Com relação à posição anatômica do ovário, o número de folículos entre o ovário direito e esquerdo diferiu significativamente. De acordo com os estudos histológicos de ERICKSON (1966a) em bovinos e de KORING *et al.* (1994) em primatas (não humanos), não existiu diferença significativa no número de folículos pré-antrais observado em ambos os ovários. Já para caprinos (RODRIGUES, 1997) observou que o ovário direito apresentou uma tendência maior no número de folículos do que o ovário esquerdo, sendo a razão, para tal, ainda desconhecida.

A diferença significativa persistiu, quando se separou o número de folículo entre o ovário direito e esquerdo para os animais imaturos, permanecendo o ovário esquerdo com maior número de folículos, sendo esta diferença não observada em animais maduros, possivelmente pelo pequeno tamanho amostral. Sabe-se que os folículos primordiais são ativados ou durante a vida fetal (primatas e ruminantes) ou no início do período neonatal (roedores e coelho) (MARIANA *et al.*, 1991; FORTUNE, 1994) e que a ativação desses folículos corresponde à passagem do pool de reserva para o pool de folículos em crescimento. De acordo com LUNENFELD, *et al.* (1975) dois fatores intraovarianos podem influenciar o início do crescimento folicular: a degeneração dos folículos grandes e o tamanho do pool de

folículos pequenos que não estão em crescimento. Considerando que a funcionalidade do ovário seja o número de folículos recrutados para um estágio superior, supõe-se que o ovário esquerdo, por apresentar um número maior de folículos pré-antrais (pool de reserva), possa influenciar um maior número de folículos a serem recrutados, uma vez que o número de folículos pré-antrais os quais deixam o pool de reserva podem ser predeterminado geneticamente (EDWARDS et al., 1997), podendo indicar uma funcionalidade maior quando comparado ao ovário direito, concordando com os trabalhos de HARRISON & BROWNER (1971), BEST & DA SILVA (1984) E ROSAS (2000) os quais observaram, por meio de cicatrizes ovulatórias, que fêmeas de *S. fluviatilis* ovulam em ambos os ovários, no entanto a maturidade do ovário esquerdo é atingida antes do que a maturidade do ovário direito. No presente estudo, contudo, não foram verificadas a polaridade da ovulação e a classificação dos folículos pré-antrais, dados importantes para a suposição acima.

Neste trabalho também foram estudadas as relações entre o número de folículos pré-antrais e o peso dos ovários. Considerando o número total de ovários analisados, verificou-se que o número de folículos foi negativamente correlacionado com o peso ovariano, não havendo uma diferença significativa do lado do ovário. Estes resultados estão diretamente relacionados com a composição do tecido ovariano. Foi observado que os valores encontrados para o peso ovariano em animais maduros, foi superior àqueles observado em animais imaturos. Este resultado está de acordo com a literatura, pois é bem conhecido que diferentemente de animais jovens, os ovários oriundos de animais adultos contém um maior conteúdo fibroso (NICOSIA et al., 1975) e podem conter corpo(s) lúteo(s), os quais contribuiriam para aumentar o peso dos ovários (GONZALES-STAGNARO & MARRIO-BURY, 1993). Desta maneira, os ovários mais pesados, podem apresentar maior conteúdo fibroso, reduzindo o espaço para os folículos.

Os resultados aqui apresentados indicam que para os espécimens de *S. fluviatilis*, provenientes da costa do Ceará, o estudo da população folicular pré-antral se processou dentro dos padrões definidos para outras espécies de mamíferos. Futuros estudos em relação à população folicular pré-antral, reprodução e maturação sexual, devem focar os aspectos quanto à classificação e morfometria dos folículos pré-antrais, polaridade da ovulação, comprimento e idade de maturação sexual, que não puderam ser amplamente explorados dentro do espectro desta dissertação.

7 CONCLUSÃO

Este estudo relata pela primeira vez aspectos iniciais envolvidos na foliculogênese em *Sotalia fluviatilis*, onde se observou que o número de folículos pré-antrais de *S. fluviatilis* pode ser influenciado pelo estágio reprodutivo (indivíduos imaturos apresentam um maior número de folículos pré-antrais), peso (quanto maior o peso do ovário a quantidade de folículos pré-antrais diminui), idade (quanto maior a idade menor a quantidade de folículos pré-antrais). Também foi observado que a posição anatômica do ovário influencia a população folicular pré-antral, sendo levantada a hipótese de que possa haver uma maior funcionalidade do ovário esquerdo quando comparado ao direito.

Sob o ponto de vista da conservação, o presente estudo apresentou a primeira etapa indispensável para o processo de preservação do potencial oocitário de animais de elite ou daqueles em via de extinção. Os dados quantitativos da foliculogênese descritos no trabalho, poderão servir como parâmetro para futuros estudos *in vivo* ou *in vitro* da foliculogênese em *S. fluviatilis*. Dessa forma, novas informações acerca dos folículos pré-antrais de *S. fluviatilis* poderão ser obtidas, gerando mais oportunidade para a realização de novas pesquisas, visando a elucidação da foliculogênese na fase pré-antral na espécie, o que contribuirá no futuro para um melhor aproveitamento do seu potencial oocitário.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anatomical Record**, v. 94: p. 2339-2447, 1946.
- ALVES-JUNIOR, T. T.; ÁVILA, F. J. C.; OLIVEIRA, J. A. *et al.* Registros de cetáceos para o litoral do Estado do Ceará. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, v.30, n.1-2, p.33-39, 1996.
- AMORIM, C. A. **Estudo da população de folículos pré-antrais ovinos, desenvolvimento de uma nova biotécnica para o isolamento e caracterização folicular**. Fortaleza, 1998. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes, Universidade Estadual do Ceará, 1998).
- BAKER, T. G.; HUNTER, R. H. F. Interrelationships between the oocyte and somatic cells within the graafian follicle of mammals. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys**, v.18, n. 2B, p. 419-426, 1978.
- BAKER, T. G., HUNTER, R. H. F. Oogenesis and ovulation. In. AUSTIN, G. R, SHORT R. V. (eds.), **Reproduction in mammals: Germ Cells and Fertilization**. Cambridge University , p. 17-45, 1982.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. Manote, 1992.
- BECKERS, J. F., DRION, P. V., FIGUEIREDO, J. R. *et al.* The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 31: p.543-548, 1996.
- BEST, R. C., DA SILVA, V. M. F. Preliminary analysis of reproductive parameters of boto, *Inia geoffrensis*, and the tucuxi, *Sotalia Fluviatilis*, in the Amazon River system. **Rep. Int. Whal. Commn.**, n.6, p.361-369, 1984.
- BETTERIDGE, K. J., SMITH, C., STUBBINGS, R. B., *et al.* Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J. Reprod. Fert.**, suppl. 38, p. 87-98, 1989.
- BOROBIA, M. **Distribution and morfometrics of South American dolphins of the genus Sotalia**. 1989. Dissertação (Master of Science Macdonald College, MC Gill University, 1989).
- BOROBIA, M., BARROS, N. B. Notes on the diet of marine *Sotalia fluviatilis*. **Mar. Mammal Sci.**, n. 5, v. 4, p. 395-399, 1989.
- BOROBIA, M., SERGEANT, D. E. Variation in skull of the genus *Sotalia*. In: International Theoriological Congress, 5 th., 1989, Rome. **Abstracts Rome**, p.480, 1989
- BOROBIA, M., BARROS, N. B., LODI, L., *et al.* Ecologia alimentar da forma marinha de *Sotalia fluviatilis*: uma análise preliminar. In: **Anais da IV Reunião de Trabalhos de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul**, Valdívia, 1990.

BOROBIA, M., ROSAS, F. C. W. Tucuxi. In: CAPOZZO, H. L., JUNIN, M. (eds.). **Estado de conservación de los mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental**. p. 36-41 (Informe y estudios del Programa de mares Regionales del PNUMA, 138), 1991.

BOROBIA, M., SICILIANO, S.; LODI, L.; HOEK, W. Distribution of the South American dolphin *Sotalia fluviatilis*. **Can. J. Zool.**, New York, v. 69, p.1025-1039, 1991.

BOSSENECKER, P. J. The capture and care of *Sotalia guianensis*. **Aquatic Mammals**, v. 6, n. 1, p.13-17, 1978.

BOYDE, A. Histological studies of dental tissues of odontocetes. **Rep. Int. Whal. Commn**, v. 6, n. 1, p. 149-158, 1980.

BLONDIN, P., DUFOUR, M., SIRARD, M. A. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: Flow cytometry, enzyme linked immunosorbent assay, and classic histology. **Biol. Reprod.**, n. 54, p. 631-637, 1996.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicles growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v. 109: p. 165-171, 1997.

CAHILL, L. P.; MARIANA, J. C.; MALÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **J. Reprod. Fert.**, v. 55, p. 27-36, 1979.

CAHILL, L. P., MALÉON, P. Influences of season, cycles and breed on follicular growth rates in sheep. **J. Reprod. Fert.**, v. 58, p. 321-328, 1980.

CLAVER, J. A.; SECCHI, E. R.; MURIAIS, I. L., *et al.* Observaciones histológicas in ovarios de Franciscana (*Pontoporia blainvillei*), 1994.

COCKCROFT, V. G.; ROSS, G. J. B. Age, growth and reproduction of bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the East Coast of Southern Africa. **Fish. Bull.**, v. 88, p. 289-302, 1989.

COLLET, A. An examination of the gonads of *Cephalorhynchus comersonii* taken from the Kerguelen islands, 1990.

CRESPO, E. A., PERZ-MACRI, G., REYS, L., *et al.* Estudios sobre determinación de edad en mamíferos marinos del Atlántico Sudoccidental. In: Reunión de Trabajos de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, 4, 1990, Valdivia. **Anais da IV Reunión de Trabajos de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur**, Valdivia: p. 31-55, 1994.

DA SILVA, V. M., BEST, R. C. *Sotalia fluviatilis*. **Mammalian Species**, v. 527, p.1-7, 1996.

DI BENEDETTO, A. P. M. **Captura accidental de pequenos cetáceos em rede de espera: Uma ameaça às populações do norte do Rio de Janeiro?** Rio de Janeiro, 1997, 91p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1997).

DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 655-79, 1993.

DRAPER, N., SMITH, H. Applied regression analysis. John Wiley e Sons. 2 ed., 1981.

DRIANCOURT, M. A., CAHILL, L. P., BINDON, B. M. Ovarian follicular populations and preovulatory in largement in Booroola and control Merino ewes. **J. Reprod. Fert.**, v. 73, p. 93-107, 1985.

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

DUFOUR, J. J., GUILBAULT, L. A. Ovarian follicular population changes with the advance of the breeding season in intact and unilaterally ovariectomized ewes. **J. Reprod. Fert.**, v. 70, p.363-368, 1984.

EDWARDS, R. G., FOWLER, R. E., GORE-LANGTON, R.E., *et al.* Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 51, p.237-263, 1977.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v. 10, p. 97-105, 1966a.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of posnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, v. 25, p. 800-805, 1966b.

ERICKSON, B. H., REYNOLDS, R. A., MURPHREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the age cow. **Biol. Reprod.**, v. 15, p. 555-560, 1976.

ERICKSON, G. F. Analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 4, p. 233-254, 1986.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S. C. J., VAN DEN HURK, R., *et al.* Development of a new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p.789-799, 1993.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S. C. J., BECKERS, J. F. Nova biotecnologia: isolamento, caracterização e cultura de folículos ovarianos pré-antrais em bovinos. In: I Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Mamíferos Domésticos, 1995, Fortaleza. **Anais I Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Mamíferos Domésticos. Fortaleza**, p. 10-11, 1995a.

FORTUNE, J. E., SIROIS, J., TURZILLO, A. M. *et al.* Follicle selection in domestic ruminants. **J. Reprod. Fert.**, v. 43, p. 187-198, 1991.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v. 50, p.225-232, 1994.

- FURTADO-NETO, M. A. A. **Molecular systematic and population genetics of marine vertebrates from Brazil**. 1998. 188p. Thesis (PhD Memorial University of Newfoundland, St. John's, 1998).
- FURTADO-NETO, M. A. A., DA SILVA, V. M. F., MONTEIRO-NETO, C., *et al.* Sequence variation on the tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) indicates the presence of two populations in Brasil. **Aquatic Mammals**, Inglaterra, v. 27, 2000.
- GASKIN, D. E, SMITH, G. J. D., WATSON, A. P., *et al.* Reproduction in the Porpoise (Phocoenidae): implications for management. **Rep. Int. Whal. Commn.** n.6, p.135-148, 1984.
- GERVAIS & DEVILLE, in Gervais, **Bull. Soc. Agri.**, p.148, 1853.
- GINTHER, O. J., KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenol.**, v. 42, p. 987-1001, 1994.
- GINTHER, O. J., WILTBANK, M. C., FRICKE, P. M., *et al.* Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 55: p. 1187-1194, 1996.
- GONZÁLES-STAGNARO, C., MADRID-BURY, N. Cambios ováricos durante el ciclo estrual en cabras criollas. **Revista Científica**, v. 3, p. 87-97, 1993.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle**, 1st ed., Cab International, Cambridge, p. 640, 1994.
- GORDON, I. Preantral development of the bovine ovary. GORDON, I (ed) In: **Laboratory Production of Cattle Embryos, Cambridge**: CAB International: Raven Press, p. 43-49, 1995.
- GOUGEON, A., CHAINY, G. B. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **J. Repr. Fertil.**, v. 81, p. 433-442, 1987.
- GREENWALD, G. S., MOOR, R. M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **J. Reprod. Fert.**, v. 87, p. 5561-5571, 1989.
- GRIMES, R. W., MATTON, P., IRELAND, J. J. A comparison of histological and non histological indices of atresia and follicular function. **Biol. Reprod.**, n. 37, p. 82-88, 1987.
- GUNDERSEN, H. I. G., BAGGER, P., BENDTSEN, T.F., *et al.* The new stereological tools: disector, fractionator and point sample intercepts and their use in pathological research. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol.**, v. 96, p. 379-394, 1988.
- HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, p. 212-55, 1995.
- HARRISON, R. J. Observations on the female reproductive organs of the ca'aing whale *Globicephala melaena* traill. **J. Anat.** V. 83, p. 238-2553, 1949.
- HARRISON, R. J. Reproduction and reproductive organs. ANDERSEN, H.T. (ed.). In: **The biology of marine mammals**. New York: Academic Press, 511p., p. 253-348, 1969.

HARRISON, R. J., BROWNELL, JR., BOICE, R. C. Reproduction and gonadal appearances in some odontocetes. In: HARRISON, R. J. (ed.). **Functional anatomy of marine mammals**, London: Academic Press, v. 1, 451pp., 1972.

HARRISON, R. J., BRYDEN, M. M., McBREARTY, D. A., *et al.* The ovaries and reproduction in *Pontoporia blainvillei* (cetacea: Platanistidae), **J. Zool.**, v. 193, p. 563-5580, 1981.

HETZEL, B., LODI, L. **Baleias, botos e golfinhos**. Guia de identificação para o Brasil. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 277pp., 1993.

HIRSHIFIELD, A. N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biol. Reprod.** v. 38: p. 1181-1188, 1988.

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

HIRSHIFIELD, A. N. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats. **Biology of reproduction**, v. 47, p. 466-472, 1992.

HOHN, A. A., HAMMOND, P.S. Early postnatal growth of the spotted dolphins, *Stenella attenuata*, in the offshore eastern tropical pacific. **Fish. Bull.**, v. 83, n. 4, p. 553-566, 1985.

HOHN, A. A., SCHOTH, M. D., WELLS, R. S., *et al.* Growth layers in teeth from known age, free-ranging bottlenose dolphins. **Mar. Mammal Sci.**, v. 5, n. 4, p. 315-342, 1989.

HOHN, A. A., READ, R. J., FERNANDEZ, S., *et al.* Life history of the vaquita, *Phocoena sinus* (Phocoenidae, Cetacea). **J. Zool.**, v. 239, p. 235-251, 1996.

HUGHES, F. M., GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**, n. 129, p. 2415-2422, 1991.

HUI, C. A. Reliability of using dentinal layers for age determination in *Turciops truncatus*. In: PERRIN, W. F., MYRICK, A. C. (eds). **Age determination of toothed whales and sirenians**. Rep. Int. Whal. Comm. Special issue 3, p. 299, 1980a.

HULSHOF, S. C. J., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J. B., *et al.* Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Quart. J. Vet. Sci.**, v.16, p. 78-80, 1994.

INGRAM, D. L. Atresia. In: ZUCKERMAN, S. **The ovary**. Academic Press, New York, p. 247-273, 1962.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **J. Reprod. Fert.**, v. 34, p. 39-54, 1987.

IVASHIN, M. V. Characteristics of ovarian corpora in dolphins and whales as described by soviet scientists. **Rep. Int. Whal. Comm.**, n.6, p. 433-444, 1984.

- IWC. Report of workshop on determination age of odontocete cetaceans international whaling commission, La Jolla, 1978, **Rep. Int. Whal. Commn.**, v. 3, p. 1-50, 1980.
- JEFFERSON, T. A, LEATHERWOOD, S., WEBBER, M. A. **FAO Species identification guide Marine Mammals of the world**. Rome: FAO/UNEP, 320pp.1993.
- JORIO, A., MARIANA, I. C., LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D man and Timahdite sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, n. 26, p. 239-250, 1991.
- KASUYA, T. Reconsideration of life history parameters of spotted and striped dolphins based on cemental layers. **Sci. Rep. Whales Res. Inst.**, Tokyo, v. 28, p. 73-106, 1976.
- KATOMA, S., WHITEHEAD, H. Are cetacea ecologically important? *Oceanogra. Mar. Biol.*, n. 26, p. 553-568, 1988.
- KIRBY, V.L; RIDGWAY, S.H. Hormonal evidence of spontaneous ovulation in captivedolphins *Tursiops truncatus e Delphinus delphis*. Rep. Int. Whal. Commn. n.6, p. 459-464, 1984.
- KLINOWSHKA, M. Dolphins, porpoises and whales of the world. **The IUCN Red Data Book**. Gland, Switzerland: IUCN, 429pp., 1991.
- KOERING, M. J., DANFORTH, D. R., HODGEN, G. D. Early folliculogenesis in primate ovaries: testing the role of strogen. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 890-897, 1991.
- KOERING, M. J., DANFORTH, D. R., HODGEN, G. D. Early follicle growth in the juvenile macaca monkey ovary: the effects of estrogen priming and follicle stimulating hormone. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 686-694, 1994.
- LAND, R. B. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and finnish landrace cross blackface and welsh sheep. **J. Reprod. Fert.**, v. 70, p. 1655-173, 1970.
- LUCCI, C. M., AMORIM, C.A, RODRIGUES, A. P. R., FIGUEIREDO, J. R., *et al.* Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Anim. Reprod. Sci.**, n. 56, p. 223-236, 1999.
- LUCY, M. C., SAVIO, J. D., BANDINGA, L., *et al.* Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.
- LUNENFELD, B., KRAIEM, Z., ESHKOL, A. The function of the growing follicle, **J. Reprod. Fert.**, v. 45, p. 567-574, 1975.
- LUSSIER, J. G., MATTON, P., DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fer.**, v. 81, p. 301-307, 1987.
- MARIANA, J. C., MONNIAUX, D., DRIANCOURT, M. A., *et al.* Folliculogenesis. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**. San Diego: Academic Press, p.119-171, 1991.

- MARSH, H., KASUYA, T. Changes in the ovaries of the short-finned pilot whale, *Globicephala macrorhynchus*, with age and reproductive activity. **Rep. Int. Whal. Commn.**, n.6, p.311-333, 1984.
- MCDougall, K., HAY, M. A., GOODROWE, K. L., *et al.* Changes in the number of follicles and oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. **J. Reprod. Fertil.**, v. 51, suppl., p. 25-31, 1997.
- MONNIAUX, D., MARIANA, J. C., GOGNIÉ, Y., *et al.* Controle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammiferes domestiques. **Contracept. Fertil. Sex.**, v. 21, p. 403-407, 1993.
- MONNIAUX, D., HUET, C., BESNARD, N., *et al.* Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement.**, n.51, p. 3-23, 1997.
- MONTEIRO-NETO, C. A mortalidade de pequenos cetáceos por ação da pesca artesanal. **Boletim Informativo da Associação Brasileira de Oceanografia**, v.12, n.4, p.11, 1993.
- MONTEIRO-NETO, C., ALVES JUNIOR, T. T. ÁVILLA, F. J. C., *et al.* Impact of fisheries on the tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) and rough-toothed dolphin (*Steno bredanensis*) populations off ceara stat, northeastern brazil. **Aquatica Mammals**, Inglaterra, v. 26, n. 1, p. 49-56, 2000.
- MURDOCH, W. J. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. **Biol. Rev.**, v. 71, p. 529-5443, 1996.
- MYRICK Jr, A.C. Some new and potential uses of dental layers in studying delphinid population. In: Dolphin Societies. K. Pryor and K.S. Norris (eds.), Discoveries and Puzzele, University of California Press, pp.2551-279, 1991.
- NICOSIA, S. V., EVANGELISTA, I., BATTÀ, S. K. Rabbit ovarian follicle, isolation technique amd characterization at different stages of development. **Biology of Reproduction**, v. 13, p. 423-447, 1975.
- NORRIS, K. S. Standardized methods for measuring and recording data on the smaller cetaceans. **J. Mamm.**, v. 4, p. 471-476, 1961.
- OHSUMI, S. Comparison of maturity and acumulation rate of corpora albicantia between the left and right ovaries in cetacea. **Scient. Rep. Whal. Inst.**, v. 18, p. 123-148, 1964.
- OHSUMI, S., KASUYA, T., NISHIWAKI, M. Acumulation rate of dentinal growth layers in the maxillary tooth of the sperm whale. **Rep. Whal. Inst.**, v. 28, p. 15-34, 1984.
- PEI-XUN, C., REN-JUN, L., KE-JIE, L. Reproduction and the reproductive system in the beiji, *Lipotes vexillifer*. **Rep. Int. Whal. Commn.** n.6, p. 445-450, 1984.
- PERRIN, W. F., COL, J. M., ZWEIFEL, J. R. Growth and reproduction of spotted porpoise, *Stenella attenuata*, in the offshore Eastern Tropical Pacific. **Fish. Bull.**, v. 74, n. 2, p. 229-270, 1976.

- PERRIN, W. F., DONOVAN, G.P. Report of the Whorkshop – Cetacean Reproduction: Estimating parameters for stock assement and management. In: PERRIN, W. F., BROWNELL, R. L. (eds.). **Reproduction in whales, dolphins and porpoises**. Rep. Int. Whal. Commn., n. 6, p. 495, 1984.
- PERRIN, W. F., MYRICK JR., A. C. Age determonation of tothed whales and sirenians. **Rep. Int. Whal. Commn, Cambridge**, v. 3, p. 229, 1980.
- PERRIN, W. F., REILLY, S. B. Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family delphinidae. **Rep. Int. Whal. Commn.**, n.6, p. 97-125, 1984.
- PERRIN, W. F. **Dolphins, porpoises and whales**: an action plan for conservation of biological diversity: 1988-1992. IUCN/SSC, 1988.
- PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v. 16, n. 3, p. 271-278, 1976.
- PINEDO, M. C., HOHN, A. A. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for precision in age estimation. **Mar Mamm. Sci.**, v. 16, p. 1-27, 2000.
- RAMOS, R. M. A. **Determinação de idade e biologia reprodutiva de *Pontoporia blainvillei* e da forma marinha de *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Pontoporiidae e Delphinidae) no norte do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 1997, 95p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadusl do Norte Fluminense, 1997).
- RODRIGUES, A. P. R. **Isolamento mecânico de folículos pré-antrais caprinos in vitro**. Fortaleza, 1997, 96p. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes, Uneversidade Estadual do Ceará, 1997).
- RODRIGUES, A. P. R., AMORIM, C. A., LUCCI, C. M., FIGUEIREDO, J.R. Foligulogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v. 6, n. 1, p. 6-19, 1998.
- ROY, S. K., GREENWALD, G. S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. **Biol. Reprod.**, v. 32, p.203-215, 1985.
- RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, n. 24, p. 77-92, 1983.
- SAUMANDE, J. Ovogênese et folliculogênese. **Rec. Mèd. Vèt.**, v. 157, p. 29-38, 1981.
- SAUMANDE, J. La folliculoogénese chez les ruminantes. **Rec. Mèd. Vèt.**, v. 167, n. 3/4, p. 205-218, 1991.
- SERGEANT, D. E. The biology of pilot or pothead whale, *Globicephala malaena* (traill) in Newfoundland waters. **Bull. Fish. Res. Board Canada**. v. 132, p. 1-84, 1962.
- SERGEANT, D. E., CALDWEEL, D. K., CADWEEL, M. C. Age, growth and maturity of botlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*) from Northeast Florida. **J. Fish Res. Board Can**, v. 30, p. 1009-1011, 1973.

SCHMIEGELOW, J. M. M. **Estudo sobre cetáceos odontocetos encontrados em praias da região entre Iguape (SP) e baía de Paranaguá (PR) (24°42'S-25°28'S) com especial referência a *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853) (Delphinidae)**. São Paulo, 1990, 149p. Dissertação (Mestre em Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, 1990).

SCHROEDER, J. P. Reproductive aspects of marine mammals. In: LESLIE A., DIERAUF, V. M. D (eds.). **CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: health, disease and rehabilitation**, CRC Press, p.353-369, 1990.

SLIJPER, E. J. Walvissen (translated by Pomerans, A.J. into English, Hertchinson, London, 1962, 457p.), 1958.

SLIJPER, E. J. Functional morphology of the reproductive system in cetacea. In: NORRIS, K. S. (ed). **Whales, dolphins and porpoises**. Berkeley: University of California Press, p. 277-319, 1966.

SIMÕES-LOPES, P. C. Ocorrência de uma população de *Sotalia fluviatilis* Gervais, 1853 (Cetacea: Delphinidae) no litoral sul da sua distribuição, Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v.1, p.57-62, 1988.

SIMÕES-LOPES, P. C, XIMENEZ, A. O impacto da pesca artesanal em áreas de nascimento do boto cinza, *Sotalia fluviatilis* (Cetacea, Delphinidae), S.C., **Brasil. Biotemas**, n.3, p.67-72, 1990.

SMITH, P. W. S. O., BRAW-TAIL, R., CORRIGAN, K., *et al.* Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuse that are homozogous carries or non-carries of the fec^b gene. **J. Reprod. Fert.**, v. 98, p. 41-54, 1994.

SOKAL, R. R., ROHLF, F. J. **Biometry**. New York: W.h. Freeman and Company, 1981.

PETERS, W. S., SUMMERS, G. W. **Análise estatística e processo decisório**. Rio de Janeiro: Universidade de São Paulo, 683p., 1973

VAN DEN HURK, R., BEVERS, M. M., BECKERS, J. F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 819-832, 1997.

VAN UTRECHT, W. L. Comparison of accumulation patterns in layered dentinal tissue of some odontocete and corresponding patterns in baleen plates and ear plugs, of Balaenopteridae. **Institute of taxonomic zoology (Zoological Museum)**, v. 31, n. 6, p. 111-122, 1981.

WASSAR MAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E., NEILL, J. **The physiology of reproduction**. Raven Press, New York, p. 69-101, 1988.

WATSON, L. **Whales of the world**. A handbook and field guide to all the living species of whales, dolphins and porpoise. Hutchinson, London, p. 302, 1988.

WOOD, T. C., MONTALI, R. J., WILDT, D. Follicle oocyte atresia and temporal taphonomy in cold stored domestic cat ovaries. **Mol. Reprod. Dev.**, n. 46, p. 190-200, 1997.

YENIKO, A., MARIANA, J. C., CELEUX, G. Follicular growth during the oestrous cycles in Peul sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 21, p. 201-211, 1989.

ZANELATTO, R. C, DANS, S., CRESPO, E. A. Análise da Estrutura de idade de uma população de *Sotalia fluviatilis* Gray, 1866 (Cetacea, Delphinidae) capturadas acidentalmente durante a atividade pesqueira no litoral do estado do Paraná, Brasil. **Resumo da VII Reunion de Trabajo de Especialistas en Mamiferos Acuaticos de America de Sur**, Vinã del Mar, 64p., 1996.

ZAR, J. **Bioestatistical analysis**, New Jersey: Prentice Hall, 661p., 1996.