



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO LECTINO-HISTOQUÍMICO DE OVÁRIOS DE
PORCAS MATRIZES SEM ALTERAÇÕES E COM
DOENÇA OVARIANA CÍSTICA**

MARCELO HENRIQUE ATTA FIGUEIRA MENDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA-DF
OUTUBRO/2018**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO LECTINO-HISTOQUÍMICO DE OVÁRIOS DE
PORCAS MATRIZES SEM ALTERAÇÕES E COM
DOENÇA OVARIANA CÍSTICA**

MARCELO HENRIQUE ATTA FIGUEIRA MENDES

ORIENTADOR: FABIANO JOSÉ FERREIRA DE SANT'ANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 154/2018


**BRASÍLIA-DF
OUTUBRO/2018**

**ESTUDO LECTINO-HISTOQUÍMICO DE OVÁRIOS DE PORCAS
MATRIZES SEM ALTERAÇÕES E COM DOENÇA OVARIANA
CÍSTICA**

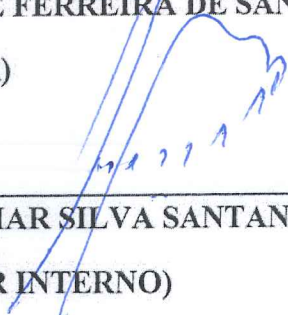
MARCELO HENRIQUE ATTA FIGUEIRA MENDES

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.**

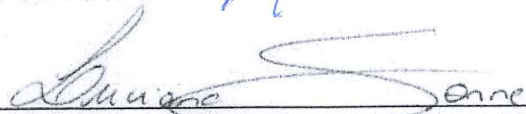
APROVADA POR:



FABIANO JOSÉ FERREIRA DE SANT'ANA, Doutor (Universidade de Brasília)
(ORIENTADOR)



MARCELO ISMAR SILVA SANTANA, Doutor (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO)



LUCIANA SONNE, Doutora (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA, 26 de outubro de 2018

MENDES, M.H.A.F. **Estudo lectino-histoquímico de ovários de porcas matrizes sem alterações e com doença ovariana cística.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 35p. Dissertação de Mestrado

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendes, Marcelo Henrique Atta Figueira.

Estudo lectino-histoquímico de ovários de porcas matrizes sem alterações e com doença ovariana cística./ Marcelo Henrique Atta Figueira Mendes; orientação de Fabiano José Ferreira de Sant'Ana
– Brasília, 2018. 35 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M)– Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2018.

1. Patologia da Reprodução 2. Doença ovariana cística. 3. Doença de suínos 4. Lectino-histoquímica. I. Sant'Ana, F.J.F. II. Estudo lectino-histoquímico de ovários de porcas matrizes sem alterações e com doença ovariana cística.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Brasília (Unb) pela oportunidade de realizar esse curso de pós-graduação.

Ao meu orientador Professor Dr. Fabiano José Ferreira de Sant'Ana por toda confiança, compreensão, amizade e boa vontade em compartilhar seus conhecimentos.

Aos Professores, Dr. Cláudio Barbeito e Dr Eduardo Gimeno, da Universidade de La Plata na Argentina, pela boa vontade e pela oportunidade do desenvolvimento conjunto dessa pesquisa científica.

A todos os meus professores, que ao longo desse curso, mostraram conhecimento e sabedoria na transmissão do conteúdo programático de cada disciplina.

A Seagri-DF pelo desenvolvimento profissional adquirido nesses anos de trabalho e pela concessão desta oportunidade de crescimento profissional.

Agradeço aos meus pais por todo o amor, carinho e dedicação que sempre tiveram por mim. Com certeza tudo que eu sou e tenho hoje é graças a vocês.

A minha esposa, companheira e amiga de sempre, Iara Maria, por todo o carinho e amor que sempre teve por mim e por todo o apoio, compreensão e estímulo na realização desse trabalho. E também, é claro, pelos nossos filhos Davi e Isadora que são a razão e alegria de nossas vidas.

A todos os meus irmãos e o restante da minha família como um todo, pelo amor, gratidão, carinho e orgulho de fazer parte desse bem tão precioso.

Ao meu amigo Dr Carlos Alberto da Cruz Junior pela nossa amizade, pelo incentivo na busca desta capacitação profissional e pela ajuda nos momentos difíceis durante esta jornada de conhecimento.

A todos os amigos que fazem parte de minha vida compartilhando e brindando os momentos vitoriosos e sempre juntos no apoio diante dos desafios que aparecem no caminho.

A Deus por ser a minha fortaleza, por sempre abençoar a minha vida e andar ao meu lado me protegendo.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho,
mas o Senhor determina os seus passos”.

Provérbios 16:9

RESUMO

A doença ovariana cística ocorre frequentemente em matrizes suínas, comprometendo a fertilidade desses animais e acarretando prejuízos ao suinocultor. É possível que a patogênese dessa importante alteração esteja relacionada a mudanças na expressão de carboidratos em folículos e em outras estruturas ovarianas. O objetivo do presente estudo foi caracterizar e comparar o padrão de ligação de lectinas (PLL) em diversas estruturas ovarianas de matrizes suínas sem alterações e com cistos. Foram usadas as seguintes lectinas biotinizadas: PNA, SBA, WGA, RCA-1, DBA e UEA-1. Nos ovários normais, a reação a UEA-1 e SBA foi discreta a moderada em células mesoteliais e endoteliais. A marcação para RCA-1 foi discreta a moderada na teca interna de folículos em crescimento, no corpo lúteo e no mesotélio. Adicionalmente, esta lectina apresentou reatividade forte em células endoteliais, células da granulosa de folículos atrésicos, zona pelúcida de folículos em crescimento e plasma. Células mesoteliais e endoteliais mostraram reatividade forte a coloração DBA. Notou-se reatividade discreta a moderada a WGA em células da granulosa, corpo lúteo e teca interna de folículos em crescimento, e moderada na zona pelúcida, em células da granulosa de folículos atrésicos e no mesotélio. A marcação para PNA foi discreta a moderada em oócitos e nas túnicas adventícia e média de artérias medulares. Alterações no PLL nos ovários císticos foram observadas, contudo não foram notadas diferenças nesse aspecto entre cistos foliculares e luteínicos. Nos ovários císticos, a reatividade a UEA-1 foi reduzida moderadamente em células mesoteliais e endoteliais, enquanto que houve redução discreta da reação a DBA nas células da granulosa. Além disso, notou-se redução da marcação com RCA-1 e WGA na teca interna, zona pelúcida e células da granulosa de folículos atrésicos. Os ovários císticos também revelaram redução discreta de reatividade a SBA no endotélio e teca interna, e de PNA nos oócitos e túnicas adventícia e média das artérias medulares. Os resultados do presente estudo demonstram que cistos modificam o PLL em ovários de matrizes suínas. Essas alterações nos glicoconjugados em muitas estruturas ovarianas pode ser uma das razões que conduzem a redução da fertilidade em matrizes suínas.

Palavras-chave: Patologia da reprodução. Doença ovariana cística. Doenças de suínos. Lectino-histoquímica.

ABSTRACT

Cystic ovarian disease occurs frequently in sows. This condition causes infertility and significant economic losses. It is possible that the pathogenesis of this important lesion be related to changes in the expression of carbohydrates in follicles and other ovarian structures. This study aims to characterize and compare the lectin-binding pattern (LBP) in many structures of normal and cystic ovaries of sows. Six biotinylated lectins (PNA, SBA, WGA, RCA-1, DBA, and UEA-1) were used on tissue sections. In the normal ovaries, the reaction to UEA-1 and SBA was mild to moderate in mesothelial and endothelial cells. RCA-1 staining was mild to moderate in theca interna of growing follicles, corpus luteum, and mesothelium. In addition, this lectin presented strong reaction in endothelial cells, granulosa cells of atretic follicles, zona pellucida of growing follicles, and plasma. DBA showed strong intensity in mesothelial and endothelial cells. There was mild to moderate reactivity to WGA in granulosa cells, corpus luteum, and theca interna of follicles in development, and moderate in zona pellucida, in granulosa cells of atretic follicles, and mesothelium. PNA staining was mild to moderate in oocytes and in the adventitia and media of medular arteries. Changes in the LBP of the cystic ovaries were noted, however there were differences in this findings between the follicular and luteinized cysts. UEA-1 reactivity in the cystic ovaries was moderately reduced in the mesothelial and endothelial cells, whereas there was mild reduction in the DBA staining in the granulosa cells. Reaction to RCA-1 and WGA in the cysts also was decreased in theca interna, zona pellucida and granulosa cells of atretic follicles. Furthermore, endothelium and theca interna in the cystic ovaries presented mild reduction of marcation to SBA, whereas there was decreased reactivity to PNA in the oocytes and adventitia and media layers of the medullary arteries. The results of the current study show that cysts modify the LBP in swine ovaries. These changes of glycoconjugates in many ovarian structures may be one of the reasons for decreased fertility in sows.

Keywords: Pathology of reproduction. Cystic ovarian disease. Diseases of swine. Lectin-histochemistry.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Página
Table 1 Lectins used in this study and their major specificities	33
Table 2 Lectin histochemical pattern of different structures of the swine ovary with and without cysts	34
Figure 1 Figure captions	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - por cento
ABC – Avidin – Biotin – Peroxidase Complex
ACTh – Hormônio adrenocorticotrófico
CA – California
CEUA-UNB – Comissão de ética de uso animal
CGP – células germinativas primordiais
CL – Corpo lúteo
cm – centímetro
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA – Conselho nacional de controle de experimentação animal
CONICET – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
DAB – Diaminobenzidine
DBA-1 – *Dolichos biflorus* – 1, *Horse gram*
FAP –DF – Fundação de apoio a pesquisa do Distrito Federal
FGF-2 – Fator de crescimento dos fibroblastos
Fig – Figure
FSH – Hormônio folículo estimulante
G – grama
GC – Camada granulosa
GNRH – Hormônio gonadotrófico
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF-2 – Fator de crescimento semelhante à insulina 2
LH – Hormônio luteinizante
M- Molar
Mg/ml – miligrama por mililitro
mm – milímetros
n – espaço amostral
PBS – phosphate buffered saline
PH – Potencial hidrogeniônico
PNA – *Arachis hypogaea*, *Peanut*
Proc – processo
RCA-1 – *Ricinus communis-1*
SBA – *Glycine max*, Soybean terminal
TE – Teca externa
TI – Teca interna
UEA-1 – *Ulex europaeus-1*
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
WGA – *Triticum vulgare*, Wheat germ

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Glicobiologia	3
2.2 Anatomia ovariana	4
2.3 Histologia ovariana	4
2.4 Ciclo estral	6
2.5 Mudanças endócrinas e celulares no processo da ovulação	7
2.6 Patologia da reprodução em matrizes suínas	9
2.7 Etiopatogenia do cisto folicular	10
2.8 Sinais clínicos	12
2.9 Macroscopia	12
2.10 Microscopia	13
3. OBJETIVO	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
5. INFORMAÇÕES ADICIONAIS	21
6. ARTIGO CIENTÍFICO	22
7. ANEXO	35

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência reprodutiva em porcas matrizes é um problema comum e importante economicamente em granjas suinícolas de várias regiões do mundo (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006). A degeneração ovariana cística, descrita pela primeira vez por Gurlt em 1631, é uma disfunção ovariana importante, tanto em humanos, quanto em animais (LOPEZ & BOSU, 1992). Os folículos císticos são o resultado de várias alterações no desenvolvimento folicular e em mecanismos ovulatórios. Como a ovulação é o resultado final de uma série de eventos coordenados pelo ovário, hipotálamo e hipófise, esse cenário dificulta a elucidação detalhada de como este distúrbio ocorre (ORTEGA et al., 2016) .

Quando acontece uma falha no processo de ovulação, o folículo envolvido normalmente regride, porém nesta doença, o folículo anovulatório continua a crescer até se tornar cístico (SUN et al., 2012). O cisto folicular caracteriza-se pela persistência de uma estrutura folicular anovulatória por período superior a 10 dias, na ausência de corpo lúteo, e com interrupção da atividade ovariana cíclica normal. Alguns dos principais sinais clínicos associados a esta falha reprodutiva é o anestro, ciclos estrais irregulares, falha de retorno ao cio e diminuição da leitegada (SCHLAFER & MILLER, 2007; EINARSSON & GUSTAFSSON, 1970).

A reprodução tem grande impacto sobre a eficiência e a produtividade da suinocultura de forma que nos sistemas contemporâneos, uma matriz pode passar mais de 90% do tempo gestante ou amamentando. Dado que os custos fixos do rebanho reprodutivo (incluindo trabalho, alimentação e espaço) são semelhantes, independentemente de uma porca produzir 16 ou 26 leitões por ano, o número de leitões viáveis produzidos por matriz é um fator importante e fundamental na eficiência das unidades comerciais (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006).

Investigações glicobiológicas da biologia reprodutiva em mamíferos sugerem que oligossacarídeos atuam como componentes funcionais essenciais de glicoproteínas envolvidas em etapas fundamentais da reprodução, tais como a maturação do ovócito, a ligação do espermatozoide ao ovócito e a fertilização (EL-MESTRAH & KAN, 2001; DESANTIS et al., 2009). A zona pelúcida é essencial no momento da fertilização e sua composição varia entre as espécies, mas, em geral, essa estrutura é constituída de três ou quatro glicoproteínas acídicas (PARILLO et al., 2005). Estudos recentes demonstram que os conteúdos de carboidratos de N- e O-oligossacarídeos possuem diferenças interespecíficas e estas podem

estar relacionadas à ligação do espermatozoide ao oócito (CHAPMAN et al., 2000; PARILLO et al., 2005).

A lectino-histoquímica é uma importante técnica utilizada com bastante eficácia na identificação e caracterização *in situ* de carboidratos em folículos ovarianos. As lectinas são um grupo de proteínas que têm a propriedade de ligação a certas estruturas de cadeias de carboidratos específicos, incluindo as relacionadas às glicoproteínas, glicolipídeos e glicosaminoglicanos (DEBRAY et al., 1981; DESANTIS et al., 2009).

Em porcas, o padrão normal e possíveis mudanças dos carboidratos nos glicoconjugados de diferentes estruturas nos ovários císticos não têm sido realizados até o momento e essas informações podem contribuir para o esclarecimento da etiopatogenia da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glicobiologia

Por muitos anos, os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos chamaram atenção dos pesquisadores mundialmente. Os carboidratos, provavelmente por serem muito complexos e não estarem codificados no genoma, só receberam devida importância mais recentemente com a expansão do campo da glicobiologia (LI et al., 2008; GHAZARIAN et al., 2011).

Os carboidratos são, de longe, as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas na natureza, e quase todos os organismos sintetizam e metabolizam essas moléculas. A glicose, por exemplo, é um monossacarídeo comum que é oxidado na forma de dióxido de carbono e água, fornecendo energia para processos celulares como a síntese de proteínas, movimento e transporte. Plantas e animais agregam numerosas moléculas de glicose para formar grandes moléculas de armazenamento de energia como o amido e o glicogênio (GHAZARIAN et al., 2011).

A maioria dos oligossacarídeos existe na forma de glicoproteínas e glicolipídeos, muitos dos quais são localizados na superfície celular (SHIMAA et al., 2006). A complexidade e variabilidade das estruturas dos glicanos na forma de glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos) permitem que eles atuem como moléculas de sinalização, reconhecimento e adesão (LI et al., 2008). Sendo assim, esses carboidratos estão envolvidos em muitas funções fisiológicas que incluem desenvolvimento embriológico, diferenciação, crescimento, inibição, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, interação patógeno-hospedeiro, resposta imunológica, metástase, entre outros (ROSENFELD et al., 2007; BLOMME et al., 2009; TANIGUCHI & KOREKANE, 2011; GHAZARIAN et al., 2011).

O reconhecimento dos glicanos como mediadores de processos biológicos importantes estimulou o interesse crescente na pesquisa em glicobiologia (ADAMCZYK, 2012). A utilização de lectinas, glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos livres e glicoconjugados (MELO-JUNIOR et al., 2011; LEAL et al., 2012), surge como uma importante ferramenta para detectar mudanças no padrão de glicosilação na superfície das células transformadas (CHANDRASEKARAN et al., 2006).

Estudos prévios demonstraram a reação e a afinidade de diversas estruturas ovarianas a muitas lectinas, especialmente ConA, DBA, SBA, RCA-1, WGA, UEA-1 e PNA, em muitas espécies de mamíferos, como ratos (SALVETTI et al., 2000; BARBEITO et al., 2013),

hamsters (EL-MESTRAH & KAN, 2001), cães (PARILLO et al., 2005) e equinos (DESANTIS et al. 2009).

O câncer de mama em mulheres é o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo, com aumento de incidência de 22% a cada ano. Estudos nas últimas décadas revelaram que a transformação maligna está associada a uma variedade de células com padrões de glicosilação alterados, como por exemplo a sialilação. Os ácidos siálicos tem sido relacionados à iniciação e progressão do câncer, tendo assim implicações potenciais na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença (MALTA, 2016).

2.2 Anatomia ovariana

O trato reprodutivo da porca madura compreende os ovários, tubas uterinas, útero, vagina e genitália externa (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006). Os ovários da fêmea suína constituem-se de um corpo maciço e elipsóide. Em geral, são encontrados na parte dorsal do abdômen, próximos às extremidades dos cornos uterinos (DYCE et al., 2004). O peso do ovário varia entre 7 e 20 g (GUIMARÃES et al., 2004) e sua estrutura normal varia de acordo com as espécies, idades e fase do ciclo estral (PRIEDKALNS & LEISER, 2006). O ovário de uma porca adulta possui uma parte central frouxa e mais vascularizada contida em um arcabouço mais denso. Os ovários possuem uma zona parenquimatosa (córtex), limitada pela túnica albugínea diretamente abaixo do peritônio, apresentando folículos disseminados em vários estágios de desenvolvimento e regressão e a região medular localizada centralmente, onde estão localizados vasos sanguíneos e nervos (DYCE et al., 2004).

Os suínos apresentam ovários móveis e irregulares, com folículos e corpos lúteos projetados em sua superfície, dando-lhes uma aparência lobulada (GETTY, 1981). Os ovários contêm numerosos folículos pequenos de 2 a 4 mm de diâmetro e vários folículos médios (oito a 15mm), de 6 a 8 mm de diâmetro (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.3 Histologia ovariana

O ovário adulto contém folículos em diferentes estágios de desenvolvimento que se localizam na sua parte mais externa, o córtex (KOERING et al., 1969; GURAYA, 1985; VAN WEZEL & RODGERS, 1996). O folículo ovariano é a unidade morfofuncional dos ovários de mamíferos, e garante o microambiente necessário para o crescimento e a maturação do ovócito (SAUMANDE, 1991). Ele desempenha duas funções que são interdependentes: a produção e liberação de hormônios esteroides e outros peptídeos e a

gametogênese. Nesta última o folículo é um elemento essencial para a manutenção, viabilidade, crescimento e maturação dos ovócitos e, finalmente, para liberar, na maioria das espécies, um complexo cumulus-ovócito maduro no processo da ovulação (ROSS et al., 1995). A formação, o crescimento e o desenvolvimento dos folículos e seus ovócitos são devido a dois processos que ocorrem concomitantemente no ovário: a folícologênese e a ovogênese, respectivamente.

A ovogênese é definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do ovócito haploide (RUSSE, 1983). As CGP têm origem extragonadal e são formadas durante o período embrionário, a partir do saco vitelínico, e se caracterizam por serem móveis e altamente invasivas (HIRSHFIELD, 1991). Nos mamíferos, ainda na vida fetal, as CGP migram para o mesênquima da crista genital e colonizam a gônada indiferenciada (WASSARMAN, 1994). A folícologênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981). Os folículos ovarianos são classificados em não cavitários ou pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) e cavitários ou antrais (folículos terciários, de Graff ou pré-ovulatórios) que são diferenciados entre si pela presença de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro. Já os folículos pré-antrais são classificados de acordo com a forma e o número de camadas de células da granulosa que circundam o ovócito (ROSS et al., 1995).

Os folículos primordiais possuem um pequeno ovócito quiescente, sem zona pelúcida, circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso. Esses folículos se apresentam desta forma, pois o ovócito não está crescendo e as células da granulosa não estão se replicando (FAIR et al. 1997). Os diâmetros de folículo, ovócito, assim como o número de células da granulosa que circundam o ovócito de folículos primordiais variam de acordo com a espécie. Quando estes folículos são ativados, seus ovócitos iniciam crescimento, com aumento de volume, e as células da granulosa passam a ter um formato cuboide, recebendo nesse estágio a denominação de folículo primário (FAIR et al., 1997). Os folículos secundários apresentam ovócito circundado por uma zona pelúcida que é constituída de glicoproteínas produzidas pelas células foliculares e por várias camadas de células da granulosa cuboide. Células especializadas do estroma iniciam sua diferenciação em teca interna, constituída de tecido conjuntivo frouxo e rica em vasos sanguíneos e em teca externa, fibrosa e resistente (RODGERS & IRVING-RODGERS, 2009).

Concomitantemente à intensa proliferação das células da granulosa, uma cavidade repleta de líquido, o antro, é formada. As células da granulosa ao redor do ovócito se diferenciam em células do cumulus e juntamente com as células da granulosa murais continuam a se multiplicar; o antro também continua a se expandir (READER, 2007). Esses folículos são chamados de antrais, que crescerão, mas apenas alguns deles serão ovulados (IRELAND, 1987).

2.4 Ciclo estral

O ciclo estral é controlado por interrelações sequenciais entre mudanças estruturais e funcionais no ovário reguladas pelo eixo hormonal hipotalâmico-pituitário-ovariano (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é sintetizado e armazenado no hipotálamo, em resposta a estímulos nervosos, atua na adeno-hipófise levando à secreção dos hormônios gonadotróficos folículo-estimulantes (FSH) e luteinizante (LH) (COFFEY et al., 1997). Tanto o FSH como o LH são armazenados na adeno-hipófise e podem ser classificados como hormônios de ação primária, ou seja, que atuam diretamente no sistema reprodutivo. O FSH estimula o desenvolvimento folicular e síntese de estrógeno pelas células da granulosa, enquanto o LH estimula a ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo (CL) e síntese de progesterona (COFFEY et al., 1997).

A fêmea suína é poliéstrica contínua (HAFEZ et al., 2004) e possui o ciclo estral de aproximadamente 21 dias, variando entre 17 e 25 dias, que pode ser dividido em quatro fases distintas: proestro (fase folicular), estro (fase folicular com receptividade sexual), metaestro (desenvolvimento inicial do corpo lúteo) e diestro (fase madura do corpo lúteo) (DUKES, 1993).

A leitoa atinge a puberdade entre seis e sete meses de idade. A idade da puberdade pode ser influenciada pelo nível de nutrição, ambiente social, peso e escore corporal (MOREIRA et al., 2006), estação do ano, raça, doenças, práticas de manejo e presença de cachaços (HAFEZ, 2004).

A receptividade sexual geralmente dura de 2 a 3 dias, embora às vezes seja mais curta em leitoas. A ovulação ocorre espontaneamente na matriz, geralmente após dois terços do período de estro ter decorrido (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006). As taxas de ovulação são mais pronunciadas no terceiro estro após a puberdade (REECE, 2005). As estimativas sugerem que o intervalo entre a ovulação do primeiro e do último folículo é entre 1 e 6 horas. O número de oócitos liberados dos ovários (taxa de ovulação) varia dependendo

da idade, raça, paridade e nutrição, mas geralmente oscila entre 10 e 24. Durante as fases lútea e folicular do ciclo estral de uma matriz suína, existem cerca de 50 folículos pequenos (2-5 mm, dos quais 10-20 se aproximam do tamanho pré-ovulatório (8-11mm). Acredita-se que a seleção de folículos destinados a ovular ocorra entre dias 14 e 16 (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006).

A taxa de fecundação em suínos normalmente é elevada podendo ser maior do que 90% e a taxa de ovulação aumenta nas gestações subsequentes. O tamanho da leitegada alcança o nível máximo por volta do quarto ou quinto parto e o desempenho reprodutivo começa a decair após 4 ½ anos (VIANA et al., 2001).

Embora possa ter sinais de cio com um a três dias após o parto, os folículos ovarianos ainda permanecem imaturos e a ovulação geralmente não ocorre. A remoção da leitegada da porca após três a cinco semanas de lactação resulta em desenvolvimento folicular, cio e ovulação dentro de quatro a oito dias (VIANA et al., 2001).

2.5 Mudanças endócrinas e celulares no processo da ovulação

O proestro (dia 16 a 21 do ciclo estral) é caracterizada pelo desenvolvimento e maturação de folículos que leva ao aumento do estrógeno, que atinge concentrações máximas dois dias antes do cio, e do declínio da progesterona (HAFEZ & ANDERSON, 2004). A maturação e desenvolvimento dos folículos ocorrem sob o estímulo do FSH (FOXCROLT & VAN DER WIEL, 1982) originando um novo ciclo estral.

O estro (dia 0 e 2 do ciclo estral) é um fenômeno fisiológico, determinado principalmente pelo aumento da concentração de estrógeno circulante, que se caracteriza por manifestações características de comportamento e alterações no trato genital feminino, como vulva edemaciada e hiperêmica, inquietação, monta sobre outros animais, sendo este período propício à recepção do macho e fertilização (SILVA et al., 2008). A receptividade sexual média varia entre 40 e 60 horas após o início do cio, ocorrendo a liberação dos oócitos sendo a duração do processo ovulatório em torno de 3,8 horas (HAFEZ & ANDERSON, 2004). Durante este período, o estradiol inicialmente suprime os níveis de LH e FSH, mas posteriormente induz aumentos pré-ovulatórios de ambas as gonadotrofinas. O pico de estradiol desencadeia o pico pré-ovulatório único de LH que inicia tanto a maturação do ovócito no folículo pré-ovulatório quanto a ruptura da parede do folículo, culminando na ovulação. Nos folículos ovulatórios, o oócito inicia sua primeira divisão meiótica cerca de 20 horas após o pico de LH. A duração do pico de LH (43 horas) e a maturação meiótica (42-44

horas) são consideravelmente mais longas no suíno do que em ruminantes. Pulsos de LH podem ocorrer durante a fase lútea e parecem estar associados à atresia folicular e maturação. Os níveis de LH são baixos durante o restante do ciclo. Tal como acontece com o LH, os níveis plasmáticos de FSH são baixos durante a fase folicular precoce. Imediatamente após a ovulação, o declínio abrupto nas concentrações circulantes de estradiol permite um aumento acentuado na secreção de FSH, que continua por 2-3 dias após o cio. Isso precede um período de desenvolvimento folicular que resulta em aumento de dez vezes no número de folículos de tamanho médio (3-6 mm de diâmetro) entre os dias 3 e 8 do ciclo estral (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006).

O metaestro (dias 2 a 6 do ciclo estral) se inicia após a ovulação e é a fase com duração média de dois dias e é caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo com início da secreção de progesterona (FRANDSON, 1979). A cavidade dentro do folículo rompido, que no início é preenchida por sangue (corpo hemorrágico), é ocupada pela proliferação de células luteínicas que revestem originalmente o espaço, gerando um corpo sólido, conhecido como corpo lúteo (CL), com um diâmetro total de 8 a 11 mm (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Os corpos lúteos são estruturas transitórias que aumentam e diminuem entre um período de estro e o seguinte, sendo importantes como fonte de progesterona, da mesma forma que os folículos em amadurecimento são fontes de estrógeno (DYCE et al., 2004).

O diestro (dias 6 a 16 do ciclo estral) é o período caracterizado pelo aumento das concentrações séricas de progesterona. Os valores de pico ocorrem entre os dias 8 e 12, declinando repentinamente após o dia 18. A principal função da alta concentração de progesterona, encontrada nessa fase, é a manutenção da gestação (FOXCROLT & VAN DER WIEL, 1982). Essa fase termina quando ocorre a lise do CL devido à liberação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (FOXCROLT & VAN DER WIEL, 1982). O aumento da liberação uterina de PGF_{2α} na veia útero-ovariana entre os dias 12 e 16 leva a regressão lútea. Em animais cíclicos, o corpo lúteo regride rapidamente para formar corpus albicans não secretórios no dia 16, com os níveis circulantes de progesterona diminuindo rapidamente dentro de 1-2 dias (KYRIAZAKIS & WHITTEMORE, 2006).

2.6 Patologia da reprodução em matrizes suínas

Os problemas relacionados à reprodução dentro de um rebanho são a maior causa de prejuízo ao produtor. As falhas na reprodução levam diretamente ao aumento de dias não produtivos, que significam dias em que os animais estão gerando gastos à propriedade (com alimentação, manutenção, ocupação, etc.), mas não estão gerando lucro algum (BORTOLETTO et al., 2014).

Segundo Gonçalves e Palmeira (2006), o crescimento do rebanho de suínos no Brasil mantém-se constante, enquanto o número de matrizes suínas decresceu nos últimos dez anos, sendo este um fator limitante para a lucratividade da produção. Este é um fator limitante para o sucesso da produção, uma vez que a produtividade por animal deve ser elevada, visando manter ou aumentar a lucratividade com a atividade. Para isso, é realizado frequentemente o descarte das matrizes em reprodução e a substituição destas por uma fêmea jovem clinicamente sadia (leitoa de reposição), sendo este os maiores custos envolvidos na produção de suínos (BRANDT et al., 1999). Além do custo de reposição, leitoas primíparas têm baixa imunidade e baixa qualidade de colostro, comprometendo o equilíbrio imunológico do rebanho (SMITS, 2011).

Entre as falhas reprodutivas que afetam diretamente a taxa de parição encontram-se: abortamento, micotoxicoses, retornos regulares e irregulares ao estro, anestro e falhas em manter a gestação (SILVEIRA, 2007). As infecções urinárias têm grande participação nos insucessos reprodutivos de fêmeas suínas criadas em regime intensivo, uma vez que infertilidade ou subfertilidade surgem frequentemente concomitante ou posteriormente à manifestação clínica dessas infecções (MERLINI & MERLINI, 2011). Além disso, a eficiência reprodutiva pode ser afetada por fatores como detecção ineficiente do estro, cobertura em idade precoce, estimulação deficiente com o cachaço, nutrição inadequada, presença de agentes tóxicos ou infecciosos, práticas inadequadas de manejo e influências ambientais podem ser responsáveis pelos elevados níveis de falhas reprodutivas em fêmeas jovens, acarretando em seu descarte precoce (D'ALLAIRE & DROLET, 2006).

Silveira et al. (1998) observaram que, em reprodutoras idosas, os motivos para o descarte são os danos severos de locomoção, tamanho excessivamente grande das matrizes, distocias, pouca habilidade materna, baixa taxa de parição, idade avançada e cistos ovarianos. Essa última alteração representa umas das principais lesões responsáveis por infertilidade ou subfertilidade em matrizes suínas. Morfologicamente os cistos ovarianos são classificados de acordo com a estrutura ovariana ou adjacente ao ovário que originou a lesão cística. Em

porcas, os cistos ovarianos, foliculares e luteínicos, são os mais frequentes e importantes clinicamente e possuem características patogênicas muito similares (Nascimento & Santos, 2014).

2.7 Etiopatogenia do cisto folicular

O cisto folicular, ou doença ovariana cística, caracteriza-se pela persistência de uma estrutura folicular anovulatória por período superior a 10 dias, na ausência de corpo lúteo, e com interrupção da atividade ovariana cíclica normal. É a alteração regressiva mais comum do ovário. A etiopatogenia do cisto folicular não está totalmente esclarecida. Para alguns autores, se deve à exarcebada ação do FSH e a não liberação do LH pela adeno-hipófise ou a não liberação do GnRH pelo hipotálamo. Os mecanismos que levam ao desenvolvimento de cistos foliculares têm sido objeto de estudos e pesquisas por muitos anos, mas são ainda pobremente conhecidos. Acredita-se que a condição tenha etiologia multifatorial (PETER, 2004). Na porca, acredita-se que, o estresse desempenhe papel importante na etiopatogenia (SCHOLTEN & LIPTRAP, 1978). Porcas em condições de estresse sofrem elevação de glicocorticoides, resultando em comprometimento da fisiologia ovariana, especialmente entre o 14º e 16º dias do ciclo estral, período em que ocorre seleção dos folículos destinados a ovulação (LIPTRAP & VIVEIROS, 1993). Em vacas, a formação do cisto tem sido associada a muitos fatores ambientais, clínicos e hereditários (GARVERICK, 1997; MONNIAUX et al., 2008). De acordo com Ortega et al. (2016), em bovinos, a retenção de placenta, febre do leite e metrite são fatores potenciais associados a ocorrência da doença. De todos os fatores, o estresse tem sido sugerido como o principal contribuinte para a doença ovariana cística através do bloqueio do estrogênio e a diminuição do hormônio luteinizante (LH) pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Clinicamente os cistos ovarianos em vacas leiteiras estão associados à ninfomania, contudo este sinal clínico não é observado em matrizes suínas afetadas. Alguns pesquisadores apontam desequilíbrios endócrinos envolvendo o eixo hipotalâmico-hipofisário relacionados ao desenvolvimento dos cistos ovarianos em porcas (SCHOLTEN & LIPTRAP, 1978) e em vacas (GARVERICK, 1997; VANHOLDER et al., 2006). Há evidências que a carência de hormônios tireoidianos contribua com a formação de cistos ovarianos em mães (FITKO et al., 1995). Estudos prévios têm demonstrado que mudanças e desestabilização das proteínas do citoesqueleto (microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários) do ovário comprometem acentuadamente a produção de hormônios esteroides e, conseqüentemente, podem contribuir com a cistogênese (CHEN et al., 1994).

Estudos recentes demonstraram que alterações nas proteínas do citoesqueleto levam a mudanças estruturais e funcionais durante a cistogênese de ratas (SALVETTI et al., 2004), vacas (ORTEGA et al., 2007b) e porcas (SANT'ANA et al., 2015a). Essas proteínas desempenham papel importante na integridade estrutural celular, participando das ligações entre as células e dos eventos de diferenciação e proliferação celular. Ademais, as proteínas do citoesqueleto estão envolvidas na morfologia final e em várias funções das células, como o transporte intracelular, as interações núcleo-membrana plasmática e em funções nucleares (LUNA & HITT, 1992; ORTEGA et al., 2009). Há indícios que fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) são produzidos e atuam sobre as células da granulosa em ovários normais de vacas (ORTEGA et al., 2008) e que em ovários císticos ocorre diminuição da produção de fatores de crescimento em vacas (IGF-I e IGF-II) e ratas (IGF-I, fator de crescimento de fibroblastos [FGF-2] e fator de crescimento endotelial vascular [VEGF]) (ORTEGA et al., 2007a; ORTEGA et al., 2008; REY et al., 2010). Investigação recente demonstrou que cistos ovarianos foliculares e luteinizados de porcas alteraram a expressão de IGF-I, IGF-II e VEGF (SANT'ANA et al., 2015b).

Pesquisas glicobiológicas da biologia reprodutiva em mamíferos sugerem que oligossacarídeos atuam como componentes funcionais essenciais de glicoproteínas envolvidas em etapas fundamentais, tais como a maturação do ovócito, a ligação do espermatozoide ao ovócito e a fertilização (EL-MESTRAH & KAN, 2001; DESANTIS et al., 2009). A zona pelúcida é essencial no momento da fertilização e sua composição varia entre as espécies, mas, em geral, essa estrutura é constituída de três ou quatro glicoproteínas acídicas (PARILLO et al., 2005). Estudos recentes demonstram que os conteúdos de carboidratos de N- e O-oligossacarídeos possuem diferenças interespecíficas e estas podem estar relacionadas à ligação do espermatozoide ao oócito (CHAPMAN et al., 2000; PARILLO et al., 2005). L-fucose é outro carboidrato que foi identificado no reconhecimento do espermatozoide à zona pelúcida em ovócitos humanos e de guinea pig, ratos e hamsters (CHAPMAN et al., 2000; PARILLO et al., 2005). A lectino-histoquímica é uma importante técnica utilizada com bastante eficácia na identificação e caracterização in situ de carboidratos em folículos ovarianos de muitas espécies, incluindo a mulher, a rata e a égua (MAYMON et al., 1994; SALVETTI et al., 2000; DESANTIS et al., 2009; BARBEITO et al., 2013). As lectinas são um grupo de proteínas que têm a propriedade de ligação a certas estruturas de cadeias de carboidratos específicos, incluindo as relacionadas às glicoproteínas, glicolípídeos e glicosaminoglicanos (DEBRAY et al., 1981; DESANTIS et al., 2009). Em ratas com ovários

policísticos induzidos experimentalmente, foi comprovado que existem alterações evidentes no padrão lectino-histoquímico em diferentes estruturas ovarianas e que essas alterações, provavelmente, estão relacionadas ao processo de cistogênese (BARBEITO et al., 2013). Em porcas, o padrão normal e possíveis mudanças dos carboidratos nos glicoconjugados de diferentes estruturas nos ovários císticos não têm sido realizados até o momento.

2.8 Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos associados aos cistos ovarianos em porcas incluem anestro, ciclos estrais irregulares, atraso no retorno ao cio, repetição de cio, tamanho reduzido da leitegada e comportamento agressivo. Assim como nas vacas, uma das principais doenças reprodutivas em porcas é o cisto ovariano, que causa infertilidade e perdas econômicas significativas (EINARSSON & GUSTAFSSON, 1970; SCHLAFER & MILLER, 2007). Heinonen et al. (1998), em um estudo na Finlândia, mostrou que aproximadamente 50% dos 1708 órgãos reprodutivos de porcas e marrãs estudados possuíam alterações e que 6,2% apresentavam graus variáveis de folículos císticos. Em outros estudos, aproximadamente 10% das porcas abatidas para problemas de fertilidade mostraram essas estruturas ovarianas (EBBERT & BOSTEDT, 1993; CASTAGNA et al., 2004). A presença de cistos antes da inseminação e da concepção pode não interferir com a ovulação de outros folículos, mas pode diminuir o número de ovócitos viáveis normais (CASTAGNA et al., 2004) e consequentemente o número de leitões ao nascimento, ocasionando prejuízos ao suinocultor. Ortega et al. (2016) relataram que a incidência de cistos ovarianos em rebanhos leiteiros bovinos varia de 5 a 30%. Esta condição gera perdas econômicas significativas para a indústria de laticínios por aumentar o intervalo entreatos gerando um subaproveitamento da eficiência produtiva e reprodutiva dos animais e também pelo descarte dos bovinos que apresentam esta condição persistente. Em vacas, a formação do cisto tem sido associada a muitos fatores ambientais, clínicos e hereditários (GARVERICK, 1997; MONNIAUX et al., 2008).

2.9 Macroscopia

Os cistos foliculares ovarianos na porca podem ser pequenos e múltiplos, com diâmetro que varia entre 1 e 2 cm, não apresentam áreas de luteinização de sua parede e são chamados de cisto tipo estrogênico. Os cistos foliculares podem também ser múltiplos e grandes que quase sempre têm áreas de luteinização e são chamados de cistos tipo progesterônico (NASCIMENTO & SANTOS, 2011). Cistos luteinizados múltiplos, alguns

atingindo 5 de diâmetro, caracterizam a doença ovariana cística em porcas (SCHLAFER & MILLER, 2007). Caracteriza-se macroscopicamente por apresentar parede espessa e distendida, consistência firme, conteúdo líquido citrino inodoro e parede interna amarelada (NASCIMENTO & SANTOS, 2011).

2.10 Microscopia

Durante a cistogênese, a degeneração inicial das células da granulosa é seguida pela degeneração do oócito e da teca interna (luteinização da teca ocorre eventualmente), e esse fato leva à falha de ovulação de um folículo antral ovulatório. As células da granulosa podem sofrer picnose e cariorrexia e, finalmente, desaparecer da cavidade do cisto. Al-Dahash & David (1977) determinaram que as células da granulosa estavam ausentes de 50% dos cistos examinados em uma pesquisa de abatedouro, enquanto Brown et al. (1982) determinaram que as células da granulosa estavam ausentes em muitos dos cistos examinados de vacas. As células da teca interna sofrem picnose, com fibrose subsequente da parede do cisto. A luteinização da teca interna, quando ocorre, varia de pequenas áreas isoladas a crescentes áreas espessas que geralmente estão localizadas na base do cisto profundo no ovário. Foi descrito que a variação da espessura da parede do cisto se dá principalmente devido à variação na largura da teca interna (BROWN et al., 1982). Externamente, a cavidade cística é arredondada, revestida por uma camada externa de tecido conjuntivo fibroso e, internamente, por células da teca luteinizadas (ORTEGA et al, 2016).

3. OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo caracterizar e comparar, em matrizes suínas, o padrão de marcação de lectinas em diversas estruturas de ovários normais e com doença ovariana cística.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P.M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v.1820, p.1347-1353, 2012.

AL-DAHASH, S.Y.; DAVID, J.S. Histological examination of ovaries and uteri from cows with cystic ovaries. **Veterinary Record**, v.101, p.342-347, 1977.

ANDERSON, L. L.; HAFEZ, E.S.E. Suínos. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed., São Paulo: Manole, p.183-192, 2004.

BARBEITO, C.G.; ORTEGA, H.H.; MATILLER, V.; GIMENO, E.J.; SALVETTI, N.R. Lectin-binding pattern in ovarian structures of rats with experimental polycystic ovaries. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, p.850-857, 2013.

BORTOLETTO, C.; FERREIRA, G.F.; GASSER, B.; NAKAMURA, A.M.; ALMEIDA, H.M.S.; OLIVEIRA, L.G. Principais causas de problemas reprodutivos em porcas. In: **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.23, p.1679-7353, 2014.

BRANDT, N.; VON BREVERN, P.; GLODE, P. Factors affecting survival rate of crossbred sows in weaner production. **Livestock Production Science**, v.57, p.127-135, 1999.

CASTAGNA, C.D.; PEIXOTO, C.H.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; NETO, G.B.; LOPEZ-DÍAZ, M.C.; BOSU, W.T. A review and an update of cystic ovarian performance in swine herds. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.115-123, 2004.

CHANDRASEKARAN, E.V.; XUE, J.; NEELAMEGHAM, S.; MATTA, K.L. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. **Carbohydrate research**, v.341, p.983-994, 2006.

CHAPMAN, J.C.; WIEBKIN, O.W.; BREED, W.G. Interspecific variation of zona pellucida glycoconjugates in several species of marsupial. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.119, p.111-120, 2000.

CHEN, T.T.; MASSEY, P.J.; CAUDLE, M.R. The inhibitory action of taxol on granulosa cell steroidogenesis is reversible. **Endocrinology**, v.134, p.2178-2183, 1994..

D'ALLAIRE, S. D.; DROLET, R. Longevity in breeding animals - Veterinary practice. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of swine**. 9 ed. Ames: Iowa State University Press, p.1011-1025, 2006.

DEBRAY, H.; DECOUT, D.; STECKER, G.; SPIK, G.; MONTREUIL, J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. **European Journal of Biochemistry**, v.117, p.41-55, 1981.

DESANTIS, S.; VENTRIGLIA, G.; ZIZZA, S.; DE SANTIS, T.; DI SUMMA, A.; DE METRIO, G.; DELL'AQUILA, M.E. Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. **Theriogenology Animal Reproduction**, v.72, p.300-309, 2009.

- DUKES, H. H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.189, 1993.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Órgãos reprodutivos femininos: Ovários. In: **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3. ed, Elsevier Editora, p.191-192, 2004
- EBBERT, W.; BOSTEDT, H. Cystic degeneration in porcine ovaries –first communication: morphology of cystic ovaries, interpretation of the degeneration in ruminants. **Theriogenology Animal Reproduction**, v.37, p.1163-1183, 1992.
- EINARSSON, S.; GUSTAFSSON, B. Developmental abnormalities of female sexual organs in swine; a post-mortem examinations of the genital tract in 1000 gilts. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.11, p.427-442, 1970.
- EL-MESTRAH, M.; KAN, F.W.K. Distribution of lectin-binding glycosidic residues in the hamster follicular oocytes and their modifications in the zona pellucida after ovulation. **Molecular Reproduction Development**, v.60, p.517-534, 2001.
- FAIR, T.; HULSHOF, SC.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy Embryology Journal**. v.195, p.327-336, 1997.
- FITKO, R.; KUCHARSKI, J.; SZLEZYNGIER, B. The importance of thyroid hormone in experimental ovarian cystic formation in gilts. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.159-168, 1995.
- FRANDSON, R.D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 2.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p.186, 1979.
- GARVERICK, H.A. Ovarian follicular cysts in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.995-1004, 1997.
- GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed., Rio de Janeiro, Interamericana, p.326-329,1981.
- GONÇALVES, R.G.; PALMEIRA, E.M. Suinocultura Brasileira. **Revista Acadêmica de Economia**, n.71, p.1-11, 2006.
- GUIMARÃES, G. C.; MACHADO, M.R.F.; SANTOS, A.L.Q. Variáveis morfológicas dos órgãos genitais femininos de suínos da raça landrace (sus scrofa domesticus). **Bioscience Journal**, v.20, p.131-136, 2004.
- GURAYA, S.S. Biology of ovarian follicles in mammals. **Springer-Verlag, New York**, p.3-14, 1985.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Suínos. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, p.186, 2004.
- HEINONEN, M.; LEPPÄVUORI, A.; PYÖRÄLÄ, S. Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. **Animal Reproduction Science**, v.52, p.235-244, 1998.

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

KOERING, M.J. Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in *Macaca mulata*. **The American Journal of Anatomy**, v.126, p.73-101, 1969.

LI, Y. L.; WU, G.Z.; DAWE, G.S.; ZENG, L.; CUI, S.S.; LOERS, G.; XIAO, Z.C. Cell surface sialylation and fucosylation are regulated by L1 via phospholipase C γ and cooperate to modulate neurite outgrowth, cell survival and migration. **PloS One**, v.3, p.e3841, 2008.

LIPTRAP, R.M.; VIVEIROS, M.M. Stress and altered follicular development in sows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 4, p.132-142, 1993.

LUNA, E.J.; HITT, A.L. Cytoskeleton-Plasma membrane interactions. **Journal Science**, v.258, p.955-963, 1992.

MAYMON, B.B.; MAYMON, R.; BEN-NUN, I.; GHETLER, Y.; SHALGI, R.; SKUTELSKY, E. Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.81-86, 1994.

MERLINI, L.S.; MERLINI, N.B. Infecção Urinária em Fêmeas Suínas em Produção – Revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.14, p.65-71, 2011.

MOREIRA, F.; PILATI, C.; REIS, R.N.; DICK, W.; SOBESTIANSKY, J. Aspectos macroscópicos dos ovários de matrizes suínas, oriundas de granjas da microrregião de Rio Verde-GO e descartadas para abate por motivos diversos. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.47-52, 2006.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara, p.153, 2011.

ORTEGA, H.H.; AMABLE, P.; SALVETTI, N.R.; DALLARD, B.E.; BARAVALLE, C.; BARBEITO, C.G.; GIMENO, E.J. Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.36, p.94-102, 2007a.

ORTEGA, H.H.; SALVETTI, N.R.; MÜLLER, L.A.; AMABLE, P.; LORENTE, J.A.; BARBEITO, C.G.; GIMENO, E.J. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. **Journal of Comparative Pathology**, v.136, p.222-230, 2007b.

ORTEGA, H.H.; PALOMAR, M.M.; ACOSTA, J.C.; SALVETTI, N.R.; DALLARD, B.E.; LORENTE, J.A.; BARBEITO, C.G.; GIMENO, E.J. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid from cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.419-427, 2008.

ORTEGA, H.H.; SALVETTI, N.R.; REY, F.; BARBEITO, C.G.; GIMENO, E.J. Experimental models: a contribution to understand the intraovarian component of PCOS pathogenesis. In: TREDWELL, R.E. **Ovarian cysts: Symptoms, Causes and Treatment**. New York: Nova Science Publishers, 2009, p.1-29.

ORTEGA, H.H.; DÍAZ, P.U.; AMABLE, P.; SALVETTI, N.R.; HEIN, G.J.; MARELLI, B.E.; RODRIGUEZ, F.M.; STASSI, A.F.; FLORENCY, R. Follicular Cysts: A Single sign and

different diseases. A View from Comparative Medicine. **Reproduction in Domestic Animals**, v.22, p.1-12, 2016.

PARILLO, F.; ZELLI, R.; VERINI SUPPLIZI, A.; FAGIOLI, O.; GARGIULO A.M. Topographical localization of glucidic residues and their variations in the canine zona pellucida during folliculogenesis. **Journal of Molecular Histology**, v.36, p.131-137, 2005.

PETER, A.T. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.1-7, 2004.

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. In: EURELL, J.A.; FRAPPIER, B.L. **Textbook of Veterinary Histology**, 6. Ed., Blackwell Publishing, p.256-257, 2006.

READER, K.L. Quantitative ultrastructural study of oocytes during the early stages of ovarian follicular development in Boorola and Wild-Type sheep. **Thesis**. Victoria University of Wellington, Wallaceville, New Zealand. p.53 , 2007.

REECE, W. O. Functional anatomy and physiology of domestic animals. In: LINPPICOTT, W.; WILKINS, W. **Female Reproduction**, 3. Ed., p.513, 2005.

REY, F.; RODRÍGUEZ, F.M.; SALVETTI, N.R.; PALOMAR, M.M.; BARBEITO, C.G.; ALFARO, N.S.; ORTEGA, H.H. Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. **Journal of Comparative Pathology**, v.142, p.193-204, 2010.

ROSENFELD, R.; BANGIO, H.; GERWIG, G. J.; ROSENBERG, R.; ALONI, R.; COHEN, Y.; MAYA, R.B.Y. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v.70, p.415-426, 2007.

ROSS, MH., LJ., KAYE, GL. **Histology: A text and Atlas**. Ed. Williams & Wikins. 3.ed. 823p. 1995.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliografy of Anatomy**. v.24, p.77-92, 1983.

RUSCHEL, F. Ovarian cysts and their consequences on the reproductive results. **Reproduction in Domestic Animals**, v.28, p.441-450, 1993.

SALVETTI, N.R.; RICCI, N.; DALLARD, B.E.; LORENTE, J.A.; IGUZQUIZA, I.; ORTEGA, H.H. Lectin histochemical and cytometrical evaluation of the corpus luteum of the rat at the end of pregnancy. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.29, p.129-134, 2000.

SALVETTI, N.R.; GIMENO, E.J.; LORENTE, J.A.; ORTEGA, H.H. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. **Cells Tissues Organs**, v.178, p.117-125, 2004.

SANT'ANA, F.J.F.; NASCIMENTO, E.F. Alterações morfológicas da tuba uterina de matrizes suínas abatidas em matadouros da região metropolitana de Belo Horizonte. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 10, Pirassununga. **Resumos**, p.110, 2001.

SANT'ANA, F.J.F.; NASCIMENTO, E.F.; NOGUEIRA, J.C.; SERAKIDES, R. Altura do epitélio da tuba uterina normal e patológica de porcas nas fases folicular e luteínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.226-229, 2003.

SANT'ANA, F.J.F.; NASCIMENTO, E.F.; NOGUEIRA, J.C.; SERAKIDES, R. Atividade secretória de tubas uterinas com e sem patologia de porcas adultas nas fases folicular e luteínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.36-45, 2004.

SANT'ANA, F.J.F.; NASCIMENTO, E.F.; GIMENO, E.J.; BARBEITO, C.G. Cyclic related and pathological changes in the lectin-binding sites on the swine oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.40-45, 2005.

SANT'ANA, F.J.F.; NASCIMENTO, E.F.; ANDRÉS LAUBE, P.F.; GIMENO, E.J.; BARBEITO, C.G. Lectin-binding sites on the normal and pathological uterus of sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.889-893, 2009.

SANT'ANA F.J.F.; REIS JR J.L.; ARAUJO R.L.S.; GIMENO E.J.; ORTEGA H.H. Cytoskeletal proteins in the follicular wall of normal and cystic ovaries of sows. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p.119-124, 2015a.

SANT'ANA F.J.F.; REIS JR J.L.; BLUME G.R.; GIMENO E.J.; REY F.; ORTEGA H.H. Immunohistochemical expression of growth factors in the follicular wall of normal and cystic ovaries of sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.327-332, 2015b.

SCHLAFER, D.H., MILLER, R.B. Female genital system. In: MAXIE, M.G. (Ed.) **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals**. 5.ed. v.3. Saunders Edinburgh, 2007. p.429-564.

SCHOLTEN, J.A.; LIPTRAP, R.M. A role for the adrenal cortex in the onset of cystic ovarian follicles in the sow. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.42, p.525-533, 1978.

SILVA, D.M.; MURGAS, L.D.S.; ALVARENGA, A.L.N. Manejo da Cobrição na Suinocultura. **Boletim Técnico Universidade Federal de Lavras**, n. 80, p.1-13, 2008.

SILVEIRA, P.R.S.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; SOBESTIANSKY, J. Manejo da fêmea Reprodutora. In : SOBESTIANSKY, J. et al. **Suinocultura Intensiva – produção, manejo e saúde do rebanho**. 1ª. ed. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 388p., 1998.

SILVEIRA, P.R.S. Fatores que interferem na taxa de parição em rebanhos suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.32-37, 2007.

SMITS, R.J. Impact of the sow on progeny productivity and herd feed efficiency. In: **Recent Advances in Animal Nutrition – Austrália**, v.18, 2011, p.61.

SUN, Y-L.; ZHANG, J.; PING, Z-G.; WANG, C-G.; SUN, Y-F.; CHEN, L.; LI, X-Y.; LI, C-J.; ZHU, X-L.; LIU, Z.; ZHANG, W.; ZHOU, X. Relationship Between Apoptosis and Proliferation in Granulosa and Theca Cells of Cystic Follicles in Sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.601–608, 2012.

SAUMANDE, J. Ovogenese et folliculogenese. **Recueil Medicine Veterinaire**, v.157, p.29-38, 1981.

SAUMANDE, J. La folliculogenese chez les ruminants. **Recueil Medicine Veterinaire**, v.167, p.205-218, 1991.

TANIGUCHI, N.; KOREKANE, H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. **Biochemistry and Molecular Biology Reports**, v.44, p.772-781, 2011.

VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; De KRUIF, A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. **Reproduction Nutrition Development Journal**, v.46, p.105-119, 2006.

VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1003-1011, 1996.

VIANA, C.H.C.; ARRUDA, R.P.; MORETTI, A.S. Diagnóstico de cistos ovarianos pela palpação de ultra-sonografia transretal em fêmeas suínas: relato de dois casos clínicos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.35, p.64-68, 1998.

VIANA, C.H.C.; GAMA, R.D.; VIANNA, W.L. Comparação entre as técnicas de ultra-sonografia e Doppler com relação à eficiência no diagnóstico de gestação em fêmeas suínas. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, **Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos**, p.185-186, 2001.

WHITTEMORE, T.C.; KYRIAZAKIS, I. **Whittemore's Science and Practice of Pig Production**; 3.ed. p.110-113, 2006.

5. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Como parte da dissertação, foi redigido um artigo científico intitulado “Lectin-binding pattern on the normal and cystic ovaries of sows” que será submetido para publicação no periódico científico “Reproduction in Domestic Animals”.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUAUnB), sob processo UnBDOC n. 32/2018 (ANEXO 1) por estar de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA.

6. ARTIGO CIENTÍFICO

Lectin-binding Pattern on the Normal and Cystic Ovaries of Sows

MHAF Mendes¹, MHB Pinto¹, EJ Gimeno², CG Barbeito², FJF Sant'Ana¹

¹Laboratory of Veterinary Pathologic Diagnosis, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil; ²School of Veterinary Sciences, National University of La Plata, La Plata, Argentina

Contents

Cystic ovarian disease occurs frequently in sows. This condition causes infertility and significant economic losses. It is possible that the pathogenesis of this important lesion be related to changes in the expression of carbohydrates in follicles and other ovarian structures. The lectin-binding pattern (LBP) was characterized and compared in normal and cystic ovaries of sows. Six biotinylated lectins (PNA, SBA, WGA, RCA-1, DBA, and UEA-1) were used on tissue sections, and detection was performed using the streptoavidin/peroxidase method. In the normal ovaries, the reaction to UEA-1 and SBA was mild to moderate in mesothelial and endothelial cells. RCA-1 staining was mild to moderate in theca interna of growing follicles, corpora luteum, and mesothelium. In addition, this lectin presented strong reaction in endothelial cells, granulosa cells of atretic follicles, zona pellucida of growing follicles, and plasma. DBA showed strong intensity in mesothelial and endothelial cells. There was mild to moderate reactivity to WGA in granulosa cells, corpus luteum, and theca interna of follicles in development, and moderate in zona pellucida, in granulosa cells of atretic follicles, and mesothelium. PNA staining was mild to moderate in oocytes and in the adventitia and media of medullary arteries. Changes in the LBP of the cystic ovaries were noted, however there were differences in this findings between the follicular and luteinized cysts. UEA-1 reactivity in the cystic ovaries was moderately reduced in the mesothelial and endothelial cells, whereas there was mild reduction in the DBA staining in the granulosa cells. Reaction to RCA-1 and WGA in the cysts also was decreased in theca interna, zona pellucida and granulosa cells of atretic follicles. Furthermore, endothelium and theca interna in the cystic ovaries presented mild reduction of marcation to SBA, whereas there was decreased reactivity to PNA in the oocytes and adventitia and media layers of the medullary arteries. The results of the current study show that cysts modify the LBP in swine ovaries. These changes of glycoconjugates in many ovarian structures may be one of the reasons for decreased fertility in sows.

Introduction

Reproductive failure in sows is a common and important problem in porcine herds around the world. Anestrus, irregular or prolonged oestrous cycle, failure to return to heat, repeat breeding and small litter size are some clinical signs associated with lesions in the reproductive system of sows. Ovarian cyst, or cystic ovarian disease, is the main reproductive disorder of sows and causes subfertility or infertility and significant economic losses (Einarsson and Gustafsson 1970; Dalin et al. 1997; Heinonen et al. 1998; Karveliëne et al. 2007; Schlafer and Miller 2007). In a study conducted in Finland, approximately 50% of 1708 reproductive organs of sows and gilts presented ovarian changes and 6.2% of these lesions were ovarian cysts in variable degrees (Heinonen et al. 1998). Other investigation detected 4.7% of cystic ovaries in 150 sows with reproductive disturbances (Karveliëne et al. 2007).

The pathogenesis of the ovarian cysts in domestic animals has been the objective of studies and researches for many years, but is still poorly understood. Some authors believe that the etiology is multifactorial (Peter 2004; Ortega et al. 2016). Possibly, the stress contributes with the formation of the cysts in sows (Scholten and Liptrap 1978). Some researchers cite hormonal disorders affecting the hypothalamo-hypophyseal axis related to development of the ovarian cysts in sows (Scholten and Liptrap 1978). Steroidogenic enzymes can influence the ovarian steroids synthesis and play an essential role in the creation and/or course of cystic ovarian disease in sows (Kozłowska et al. 2009). Recent investigations revealed that apoptosis and cell proliferation (Sun et al. 2012) and the expression of cytoskeletal proteins (Sant'Ana et al. 2015a) and of growth factors (Sant'Ana et al. 2015b) were altered in swine cystic ovarian follicles. It is possible that pathogenesis of this important ovarian lesion to be related to changes in the expression of carbohydrates in follicles and in other ovarian structures, as previously confirmed in experimental cystic follicles of rats (Barbeito et al. 2013).

Lectin histochemistry (LHC) is an important technique effectively used in the identification and *in situ* characterization of carbohydrates in ovarian follicles of many species, such as rat, mare and women (Maymon et al. 1994; Salvetti et al. 2000; Desantis et al. 2009; Barbeito et al. 2013). Lectins consist of a group of proteins with property of ligation to specific sugar chain structures including those related to glycoproteins, glycolipids, and glycosaminoglycans (Debray et al. 1981; Desantis et al. 2009). Reproductive glycobiological

studies performed in many species indicate that oligosaccharides act as important functional components of glycoproteins involved in essential steps, such as oocyte maturation (El-Mestrah and Kan 2001; Rath et al. 2005), sperm-oocyte binding and fertilization (Desantis et al. 2009). Previous investigation demonstrated that there are evident changes in the lectin histochemistry pattern in different ovarian structures in rats with experimentally induced polycystic ovaries and that these modifications are related to the process of cystogenesis (Barbeito et al. 2013). In sows, the normal pattern and possible changes of the carbohydrates in the glycoconjugates of different structures in the cystic ovaries not have been accomplished. The purpose of this study was to characterize and compare the lectin-binding pattern in the normal and cystic ovaries of sows.

Material and Methods

Animals and post-mortem examination

The ovaries of 40 sexually mature sows, with (n = 22) and without (n = 18) cysts, were used in this study. The animals were obtained from a slaughterhouse of Goiás, Brazil. After evisceration, sections of each ovary were collected for histological and lectin histochemical analysis. The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24h, embedded in paraffin and cut into 4µm thick sections. The sections were stained with haematoxylin–eosin (HE).

Classification of follicles

Follicles were classified microscopically in primordial, primary, secondary, and tertiary according to the criteria listed in the *Nomina Histologica Veterinaria* (2017) and Priedkalns and Leiser (2006). Follicles were considered primordial when had an oocyte surrounded by a simple squamous epithelium of follicular cells. Primary follicles were composed of an oocyte surrounded by a simple cuboidal or cylindrical epithelium of follicular cells. Secondary follicles had an oocyte surrounded by a stratified epithelium of polyhedral follicular cells (granulosa cells), and tertiary follicles were composed of an oocyte surrounded by a stratified epithelium of granulosa cells; these last cells were surrounded by a multilaminar layer of specialized stromal cells (theca) and a fluid-filled cavity (antrum). Grossly, the cysts were classified in single and multiple, and histologically, in follicular and luteinized (Schlafer and

Miller 2007). Cysts classified as follicular had diameter higher than 1.1 cm and consisted of a large antrum and atrophy and degeneration of the granulosa cell (GC) layers and of the theca interna (TI) and externa (TE). Luteinized cysts were similar to follicular cysts, but there was no GC or this layer was severely atrophied and hyalinized. In addition, these cysts range from 1.1 to 5 cm and have marked luteinization of the thecas.

Lectin histochemical (LHC) procedures

After deparaffination, ovarian sections were incubated in 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min at room temperature, rinsed several times in 0.01M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and treated with 0.1% bovine serum albumin in PBS for 15 min. They were then incubated with the biotinylated lectins shown in Table 1 (Lectin Kit Biotinylated BK 1000; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

The optimal concentration for each lectin, which allowed maximum staining with minimum background, was at a dilution of 30 µg/mL in PBS, except for PNA, which was applied at a concentration of 10 µg/mL for 1h, followed by incubation with avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) (Vector Laboratories Inc.) for 45 min. The horseradish peroxidase was activated by incubation for 4–10 min with a buffered 0.05M Tris–HCl solution, pH 7.6, containing 0.02% diaminobenzidine (DAB) and 0.05% H₂O₂. All sections were counterstained with Mayer’s haematoxylin.

The following controls were performed: the lectins were omitted or blocked by incubating them with their blocking sugars (0.1–0.2M in PBS) for 1h at room temperature before application to the sections. The lectin binding was analysed using the following semiquantitative scale of the stained structures and subjectively scored as follows: (–) none, (+) weakly positive, (++) median positive and (+++) strongly positive. The structures evaluated were: granulosa, theca interna, zona pellucida and oocyte in growing normal and cystic follicles, granulosa in atretic follicles, mesothelium, corpus luteum and endothelium of blood vessels. Two pathologists blinded to previous procedures analysed the samples.

Results

Morphology

Thirty-six ovaries (18 sows) do not presented morphologic changes. Follicles in different grades of development, including primordial, primary, secondary, tertiary, and atretic follicles, corpus luteum, and corpora albicans, were noted. Macroscopic examination showed

that 44 ovaries (22 sows) presented cysts (2.2-4.0 cm in diameter). In the majority of these cases (42/44), the cysts were multiple, bilateral and occupied almost the entire ovarian parenchyma. The multiple follicular cysts were characterized for a large antral cavity and atrophy and disorganization of the granulosa cell (GC) layers and of the thecas interna (TI) and externa (TE). The multiple luteinized cysts were similar to follicular cysts, but there was no GC or this layer was severely atrophied and hyalinized. In addition, there was moderate to severe luteinization of the TI and TE. Only two ovaries presented single luteinized cyst and these cases were not considered for evaluation.

LHC pattern

The results of the LHC staining are summarized in Table 2. In the normal ovaries, the reaction to UEA-1 was mild to moderate in mesothelium (Fig. 1A) and endothelial cells, whereas SBA stained similarly in these same cells (Fig. 1B and 1C). Furthermore, theca interna of growing follicles and corpus luteum showed mild reactivity to this last lectin. RCA-1 staining was mild to moderate in theca interna of growing follicles (Fig. 1H), corpus luteum, and mesothelium (Fig. 1J). In addition, this lectin presented strong reaction in endothelial cells (Fig. 1I), granulosa cells of atretic follicles (Fig. 1F), zona pellucida of growing follicles (Fig. 1G), and plasma (Fig. 1I). DBA showed absent to mild intensity in granulosa and in the theca interna of growing follicles, and strong in mesothelial and endothelial cells (Fig. 1N). There was mild to moderate reactivity to WGA in granulosa cells (Fig. 1Q), corpus luteum, and theca interna of follicles in development (Fig. 1Q), and moderate in zona pellucida (Fig. 1S), in granulosa cells of atretic follicles (Fig. 1P), and mesothelium (Fig. 1R). PNA staining was absent to discrete in corpus luteum, mesothelium and plasma, whereas mild to moderate intensity was observed in oocytes (Fig. 1W) and in the adventitia and media of medullary arteries (Fig. 1V).

In general, all cystic ovaries presented few cyclic structures (mainly growing follicles) compared to the normal ovaries. Changes in the LHC pattern of the cystic ovaries were noted, however there were differences in this findings between the follicular and luteinized cysts. UEA-1 reactivity in the cystic ovaries was moderately reduced in the mesothelial and endothelial cells, whereas there was mild reduction in the DBA staining in the granulosa cells (Fig. 1O). Reaction to RCA-1 and WGA in the cysts also was decreased in theca interna (Fig. 1M and 1U), zona pellucida (Fig. 1L) and granulosa cells of atretic follicles (Fig. 1K and 1T). Furthermore, endothelium (Fig. 1D) and theca interna (Fig. 1E) in the cystic ovaries presented

mild reduction of marcation to SBA, whereas there was decreased reactivity to PNA in the oocytes (Fig. 1Y) and adventitia and media layers of the medullary arteries (Fig. 1X).

Discussion

For the first time, the lectin histochemistry was efficient to identify different residues of carbohydrates in multiple ovarian structures of sows, as previously demonstrated in another species, such as rats (Salveti et al. 2000; Barbeito et al. 2013), rabbits (Parillo and Verini-Supplizi 2001), and dogs (Parillo et al. 2005). Data of the present investigation are important to improve the comprehension of the events and physiologic interactions which occur throughout the reproductive cycle, including contact between gametes. In the evaluation of the normal ovaries of this study, zona pellucida and corpus luteum were moderately stained by WGA and RCA-1 lectins. These data indicate the presence of GlcNAc and β -D-galactose in these ovarian components of sows. Similar findings were noted in the zona pellucida of wild ungulates (Parillo et al. 2003). However, UEA-1 do not presented reaction in the zona pellucida in the present investigation, whereas other researchers detected mild marcation in the inner layer of the zona pellucida (Parillo et al. 2003). Similar data were observed in other species (Desantis et al. 2009; Barbeito et al. 2013). Granulosa cells only reacted positively to WGA and DBA, suggesting residues of sialic acid, lactosamin and L-Fucose in these cells. In rats, these cells are reactive to WGA, PNA, SBA, and RCA-1 (Barbeito et al. 2013). In the evaluation of granulosa cells of atretic follicles, the reactivity was moderate to strong to WGA and RCA-1, similar to the pattern observed in rats (Barbeito et al. 2013). Staining in the theca interna was mild to moderate in various lectins, as visualized in other species (Parillo et al. 2003; Barbeito et al. 2013). Mesothelial cells were the only structures that reacted to all lectins used in this study, suggesting mesothelium have a large amount of inner carbohydrates residues. In addition, endothelial cells stained positively to SBA, RCA-1, DBA, and UEA-1. Very similar findings were obtained in ovaries of rats, rabbits and dogs (Parillo and Verini-Supplizi 2001; Parillo et al. 2005; Barbeito et al. 2013). Residues of the GalNAc (PNA) were demonstrated in the adventitia and media layers of medullary arteries. Finally, the plasma content was positive to PNA and mainly to RCA-1.

Ovarian cysts are considered common reproductive changes and economically important, mainly in farm animals. However, the mechanisms responsible by the development of these cysts have been object of speculation and research for many years, but yet are poorly

known (Wiltbank et al. 2003). Many studies have demonstrated changes and mechanisms evolved in the pathogenesis of the ovarian cysts in cows (Garverick, 1997; Isobe & Yoshimura 2007; Ortega et al. 2007a; Monniaux et al. 2008; Ortega et al. 2008; Rey et al. 2010), rats (Anderson & Lee 1997; Salvetti et al. 2003; Ortega et al. 2007b; Salvetti et al. 2009), and humans (Abbot et al. 2002; Ortega et al. 2009), but there is few information about the genesis of this condition in sows. Data of the current study suggest that the formation of ovarian cysts in sows is associated to changes in the expression of residues of saccharides in many ovarian structures. Previous histochemical study performed in polycystic ovaries of rats also demonstrated that there were differences in many structures, such as granulosa, extracellular matrix and theca externa of cystic follicles when compared to normal preovulatory follicles (Salvetti et al. 2003).

Zona pellucida has been extensively studied in many species due to its importance in the fertilization and interactions between spermatozoa and oocyte. In the growing follicles, there was positive reaction to WGA and RCA-1 in the zona pellucida. This finding was not observed in the cysts. These data suggest decreasing of GlcNAc and β -D-galactose in the ovarian cysts. Similar findings were detected in ovaries of other females (Desantis et al. 2009; Barbeito et al. 2013). In the cystic ovaries, the granulosa cells of the few growing follicles do not showed reaction to lectins used in this investigation, whereas there was mild to moderate marcation to WGA, RCA-1, and UEA-1 in cystic follicles. In experimentally induced polycystic ovaries of rats, increasing of reactivity to RCA-1 and WGA was also confirmed, suggesting high availability of β -D-galactose and GlcNAc in these cystic structures (Barbeito et al. 2013). In the current study, the reactivity in the theca interna was very similar in the normal and cystic follicles, with mild increasing of WGA in the cysts.

Data of the present article show that normal and cystic ovaries of sows have residues of various mono- or disaccharides and react positively and irregularly to lectins used in this study. Furthermore, the results demonstrate that morphological and functional changes occurred in the cystic ovarian disease can modify the pattern of distribution of sugars in the swine ovary. These modifications in the glycoconjugates can contribute to subfertility or infertility in sows.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (Proc. 443769/2014-1) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Brazil) (Proc. 0193.000915/2015). The authors would like to thank the Frigorífico BRF S.A. (Rio Verde, Goiás, Brazil) for provide the ovary samples used in this study. CGB and EJJ are research career members of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina).

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

EJJ, CCB, and FJFS designed the study. MHAFM, MHBP, and FJFS collected the samples. EJJ, FJFS, MHAFM, and MHBP processed the samples to lectin histochemistry and observed the slides. FJFS, MHAFM, CGB, and EJJ analyzed and compared the results. FJFS and MHAFM written the article. All the authors corrected the article.

References

- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S, 2002: Developmental origin of polycystic ovary syndrome – a hypothesis. *J Endocrinol* **17**, 41–45.
- Anderson E, Lee GY, 1997: The polycystic ovarian (PCOD) condition: apoptosis and epithelization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *Tissue Cell* **29**, 171–189.
- Barbeito CG, Ortega HH, Matiller V, Gimeno EJ, Salvetti NR, 2013: Lectin-binding pattern in ovarian structures of rats with experimental polycystic ovaries. *Reprod Domest Anim* **48**, 850-857.
- Dalin AM, Gidlund K, Eliasson-Selling L, 1997: Post-mortem examination of genital organs from sows with reproductive disturbances in a sow-pool. *Acta Vet Scand* **38**, 253–262.
- Debray H, Decout D, Stecker G, Spik G, Montreuil J, 1981: Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosilproteins. *Eur J Biochem*, **117**, 41-55.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, De Santis T, Di Summa A, De Metrio G, Dell`aquila ME, 2009: Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. *Theriogenology* **72**, 300–309.

- Einarsson S, Gustafsson B, 1970: Developmental abnormalities of female sexual organs in swine; a post-mortem examination of the genital tract in 1000 gilts. *Acta Vet Scand* **11**, 427-442.
- El-Mestrah M, Kan FWK, 2001: Distribution of lectin-binding glycosidic residues in the hamster follicular oocytes and their modifications in the zona pellucida after ovulation. *Mol Reprod Develop*, **60**, 517-534.
- Garverick HA, 1997: Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* **80**, 995–1004.
- Heinonen M, Leppävuori A, Pyörälä S, 1998: Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. *Anim Reprod Sci* **11**, 235-244.
- Isobe N, Yoshimura Y, 2007: Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Dev* **53**, 1119-1124.
- Karveliėne B, Zilinskas H, Riskeviciėne V, 2007: Post-mortem examination of sows genital organs culled for reproductive disturbances and immunohistochemical studies on ERalpha and PR A receptors in the anoestral sows uterus. *Reprod Domest Anim* **42**, 275-281.
- Kozłowska A, Majewski M, Jana B, 2009: Expression of steroidogenic enzymes in porcine polycystic ovaries. *Folia Histochem Cytobiol* **47**, 257-264.
- Maymon BB, Maymon R, Ben-Nun I, Ghetler Y, Shalgi R, Skutelsky E, 1994: Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *J Reprod Fertil* **102**, 81–86.
- Monniaux D, Clemente N, Touzė JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S, 2008: Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod* **79**, 387–396.
- Nomina Histologica Veterinaria , 2017: International Committee on Veterinary Histological Nomenclature, 1nd edn., pp. 66. Disponível em: www.wava-amav.org/downloads/NHV_2017.pdf. Acesso realizado em 25 de maio de 2018.
- Ortega HH, Salvetti NR, Muller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ, 2007a: Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. *J Comp Pathol* **136**, 222-230.
- Ortega HH, Amable P, Salvetti NR, Dallard BE, Baravalle C, Barbeito CG, Gimeno EJ, 2007b: Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. *Anat Histol Embryol* **36**, 94–102.
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ, 2008: Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci* **84**, 419–427.
- Ortega HH, Salvetti NR, Rey F, Barbeito CG, Gimeno EJ, 2009: Experimental models: a contribution to understand the intraovarian component of PCOS pathogenesis. In: Tredwell RE (ed), *Ovarian cysts: Symptoms, causes and treatment*. Nova Science Publishers, New York, pp. 1–29.
- Ortega HH, Díaz PU, Salvetti NR, Hein GJ, Marelli BE, Rodriguez FM, Stassi AF, Rey FEJ, 2016: Follicular cysts: A single sign and different diseases. A view from comparative medicine. *Curr Pharm Des* **22**, 1-12.
- Parillo F, Verini-Supplizi A, 2001: Glycohistochemistry of the zona pellucida of developing oocytes in the rabbit and hare. *Res Vet Sci* **70**, 257–264.
- Parillo F, Dall'Aglio C, Verini Supplizi A, Ceccarrelli P, Gargiulo AM, 2003: Immunogold study on lectin binding in the porcine zona pellucida and granulosa cells. *Eur J Histochem* **47**, 353-358.

- Parillo F, Zelli R, Verini Supplizi A, Fagioli O, Gargiulo AM, 2005: Topographical localization of glucidic residues and their variations in the canine zona pellucida during folliculogenesis. *J Mol Histol*, **36**, 131-137.
- Peter AT, 2004: An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim* **39**, 1–7.
- Priedkalns J, Leiser R, 2006: Female Reproductive System. In: Eurell JA, Frappier BL (eds), Dellmann's Textbook of Veterinary Histology, 6th edn. Blackwell Publishing, Ames, pp.256-278.
- Rath D, Töpfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S, 2005: Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of “in vivo” and “in vitro” produced porcine oocyte inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* **63**, 352-362.
- Rey F, Rodriguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH, 2010: Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol* **142**, 193–204.
- Salvetti NR, Ricci N, Dallard BE, Lorente JA, Iguzquiza I, Ortega HH, 2000: Lectin histochemical and cytometrical evaluation of the corpus luteum of the rat at the end of pregnancy. *Anatom Histol Embryol*, **29**, 129-134.
- Salvetti NR, Gimeno EJ, Canal AM, Lorente JA, Ortega HH, 2003: Histochemical study of the extracellular matrix components in the follicular wall of induced polycystic ovaries. *Braz J Morphol Sci* **20**, 93-100.
- Salvetti NR, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH, 2009: An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 68.
- Sant'Ana FJF, Reis Jr JL, Araujo RLS, Gimeno EJ, Ortega HH, 2015a: Cytoskeletal proteins in the follicular wall of normal and cystic ovaries of sows. *Pesq Vet Bras* **35**, 119-124.
- Sant'Ana FJF, Reis Jr JL, Blume GR, Gimeno EJ, Rey F, Ortega HH, 2015b: Immunohistochemical expression of growth factors in the follicular wall of normal and cystic ovaries of sows. *Reprod Domest Anim* **50**, 327-332.
- Schlafer DH, Miller RB, 2007: Female genital system. In: Maxie MG (ed), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th edn. V. 3. Saunders, Edinburgh, pp.429-564.
- Scholten JA, Liptrap RM, 1978: A role for the adrenal cortex in the onset of cystic ovarian follicles in the sow. *Can J Comp Med* **42**, 525–533.
- Sun YL, Zhang J, Ping ZG, Wang CG, Sun YF, Chen L, Li XY, Li CJ, Zhu XL, Liu Z, Zhang W, Zhou X, 2012: Relationship between apoptosis and proliferation in granulosa and theca cells of cystic follicles in sows. *Reprod Domest Anim* **47**, 601–608.
- Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R, 2003: Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* **57**, 21-52.

Table 1. Lectins used in this study and their major specificities.

Acronym	Source	Major specificity
UEA-1	<i>Ulex europaeus-1</i> , Gorse	α -L-Fuc
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> , Horse gram	α -D-GalNAc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> , Peanut	β -D-Gal and (1-3)GalNAc
SBA	<i>Glycine max</i> , Soybean terminal	α -D-GalNAc and α - and β -Gal
WGA	<i>Triticum vulgare</i> , Wheat germ	α -D-GlcNAc and NeuNAc
RCA-1	<i>Ricinus communis-1</i>	β -D-Gal and α -D-Gal

Table 2. Lectin histochemical pattern of different structures of the swine ovary with and without cysts.

	PNA	SBA	WGA	RCA-1	DBA	UEA-1
Normal ovaries						
Growing follicles						
Granulosa cells			+ / ++		+	
Theca interna		/ +	+ / ++	+ / ++	/ +	
Zona pelúcida			++	++ / +++		
Oocyte	+ / ++					
Granulosa in atretic follicles			++	+++		
Corpus luteum	/ +	+	+ / ++	+ / ++		
Mesothelium	/ +	+++	++	+ / ++	+++	+ / ++
Endothelium		+ / ++		++ / +++	+++	+ / ++
Adventitia and media of arteries	+ / ++					
Plasma	+			++ / +++		
Cystic ovaries						
Cysts						
Granulosa cells			++	+		/ +
Theca interna			+	+	/ +	
Zona pelúcida						
Oocyte						
Growing follicles						
Granulosa cells						
Theca interna				+	/ +	
Zona pelúcida			++	+		
Oocyte						
Granulosa cells in atretic follicles						
Mesothelium	/ +	++ / +++	++	+ / ++	++ / +++	/ +
Endothelium				+ / ++	++ / +++	
Adventitia and media of arteries	/ +					
Plasma	/ +			+++		

() none, (+) weakly positive, (++) median positive, and (+++) strongly positive

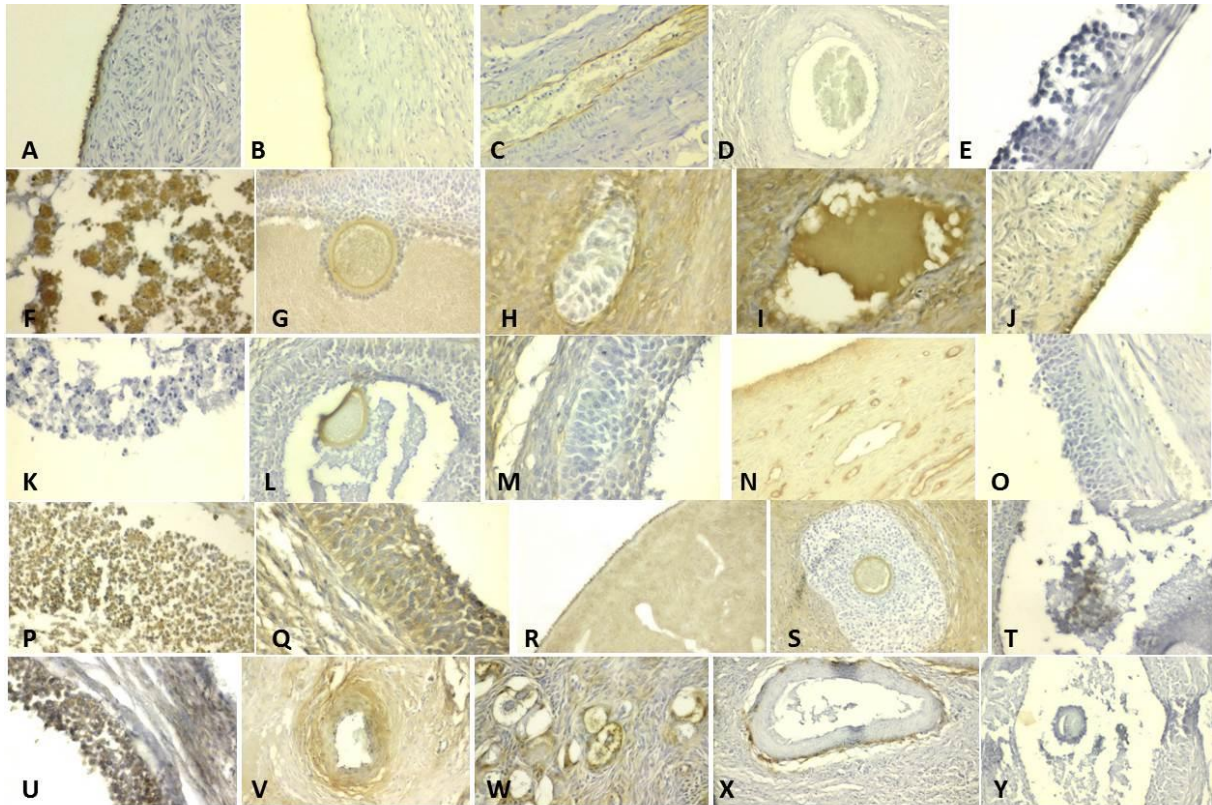


Figure 1. Figure captions. Normal ovaries: mesothelial cells with moderate reaction to UEA-1 (A) and SBA (B), 200X. Moderate and mild reactivity to SBA in endothelial cells of normal (C) and cystic (D) ovaries, 400X. E. Theca interna in cystic ovary presents reduction of SBA binding. 400X. Normal ovaries: moderate to strong reaction to RCA-1 is observed in granulosa cells of atretic follicles (F), zona pellucida (G), theca interna (H), mesothelium (J), endothelium and plasma (I), 400X. Cystic ovaries: there is reduction in the RCA-1 marcation in granulosa cells of atretic follicles (K), zona pellucida (L), and theca interna (M), 200X. N. Strong binding to DBA in mesothelial and endothelial cells in normal ovary, 200X. O. Decreased DBA reactivity in the granulosa cells of cystic ovaries, 200X. Normal ovary: moderate binding to WGA is noted in granulosa cells of atretic follicles (P), granulosa cells and theca interna (Q), mesothelial cells (R) and zona pellucida (S), 200X. Reaction to WGA in the cyst is decreased in granulosa cells of atretic follicles (T) and theca interna (U), 200X. Moderate reactivity to PNA is observed in the adventitia and media of arteries (V) and oocytes (W), 200X. There is decreased marcation to PNA in arteries (X) and oocytes (Y), 200X.

7. ANEXO

Aprovação do protocolo UnBDOC n. 32/2018 - Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA/UnB).


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 14 de junho de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ESTUDO LECTINO-HISTOQUÍMICO DE OVÁRIOS DE PORCAS MATRIZES SEM ALTERAÇÕES E COM DOENÇA OVARIANA CÍSTICA.", Protocolo n.º 32/2018, sob responsabilidade do Professor Fabiano José Ferreira de Sant'Ana foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Suis scrofa* (40 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 11/05/2018 a 28/02/2019.


UnB


Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB


CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.