

MARQUILIANO FARIAS DE MOURA

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE COMPLEXO *CUMULUS OOPHORUS*
OVINOS OBTIDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS
EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E DA GESTAÇÃO**

**Garanhuns – PE
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

MARQUILIANO FARIAS DE MOURA

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE COMPLEXO *CUMULUS OOPHORUS*
OVINOS OBTIDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS
EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E DA GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada a Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte da exigência para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Coutinho
Bartolomeu

**Garanhuns – PE
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE COMPLEXO *CUMULUS OOPHORUS*
OVINOS OBTIDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS
EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E DA GESTAÇÃO**

Dissertação elaborada por
MARQUILIANO FARIAS DE MOURA

Aprovado em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu (ORIENTADOR)

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima (UFRPE)

Prof. Dr. Alexandre José Alves (UFPB)

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales (UFPB)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
3. REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1 Foliculogênese e ovogênese	10
3.2 Maturação e competência ovocitária	12
3.2.1 Maturação citoplasmática	12
3.2.2 Maturação nuclear	13
3.3. Parâmetros utilizados como indicativos de competência ovocitária	14
3.4 Funções das células do cumulus	15
4. REFERÊNCIAS	18
5. ARTIGO: Estudo morfológico de complexo <i>cumulus oophorus</i> ovinos obtidos de folículos antrais em diferentes fases do ciclo estral e da gestação.	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
7. ANEXOS	40
7.1. Instruções aos autores da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira	41

ESTUDO MORFOLÓGICO DE COMPLEXO *CUMULUS OOPHORUS* OVINOS OBTIDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E DA GESTAÇÃO

RESUMO - Um estudo morfológico foi realizado em complexos *cumulus oophorus* de ovinos (CCOs), a fim de caracterizá-los durante as fases de proestro e diestro do ciclo estral, e durante diferentes períodos de gestação. CCOs foram colhidos a partir de folículos antrais (3-6 mm) com citoplasma regular, levemente granulado e com múltiplas camadas de células do cúmulus (CCO Grau I). Fixados em glutaraldeído e incluso em parafina, e seccionado em cortes de 5 µm. O volume médio dos oócitos com e sem zona pelúcida foram maiores nas fases de proestro, havendo redução desses volumes nas fases de diestro, G30 e G60, respectivamente. No entanto, foi observado que na fase de proestro o volume do núcleo foi inferior quando comparado aos núcleos das fases de diestro, G30 e G60. A zona pelúcida apresentou-se mais delgada à medida que no volume do oócito aumentou. As células do *cumulus* e seus respectivos núcleos mantiveram os volumes inalterados durante todas as fases estudadas. Houve diferença significativa quando comparado o volume dos tipos de células do *cumulus* em todas as fases. Também foram observados e classificados vários tipos (C1, C2 e C3) de células do *cumulus*, na fase de proestro houve uma maior proporção de células do tipo C3, seguido de significativa redução desse tipo de célula nas fases de diestro, G30 e G60. Já o tipo de célula C1 e C2 foram mais frequentes no grupo G60. Conclui-se que a morfologia das células do *cumulus*, da zona pelúcida, do citoplasma e do núcleo de complexo *cumulus oophorus* de folículos antrais ovinos apresenta-se morfolologicamente distinta de acordo com as fases do ciclo estral e gestação.

Palavras-chave: folículos ovarianos, ciclo estral, células da granulosa.

MORPHOLOGICAL STUDY OF OVINE *CUMULUS OOPHORUS* COMPLEX OF ANTRAL FOLLICLES IN DIFFERENT PHASE OF THE ESTROUS CYCLE AND PREGNANCY

ABSTRACT: It was carried out a morphological study on Oocyte *Cumulus* Complex of sheep (COCs), in order to characterize them quantitatively, both during the proestrus and diestrus phases of the estrous cycle, as well as during different periods of the gestation. COCs were collected from antral follicles (3-6 mm) with regular, slightly grainy and multiple layers of *cumulus* cytoplasm (COC Grade I) fixed on glutaraldehyde and embedded in paraffin, as well as sectioned into sections of 5 μm . The principle of the nucleator was used to estimate average volumes of oocytes, *cumulus* cells and their nuclei. The thicknesses of the pellucida zone, as well as the numerical percentages of different types of *cumulus* cells were evaluated. There was a synchronous increase of the volume of the oocyte and its nucleus from diestrus to proestrus phases. Concerning the ones collected in the gestation stages, there was a parameter volume reduction as the pregnancy progresses. The thickness of the pellucida zone was reduced during the periods approaching ovulation. Three types of *cumulus* cells were observed (C1-C3). The results suggest that *cumulus* cells respond to circulating hormone levels during the *estrous cycle* and gestation.

Key word: ovarian follicles, oestrous cycle, granulosa cells

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura foi uma das primeiras culturas pecuárias a ser introduzida pelos colonizadores portugueses. Segundo o IBGE (2010), o efetivo do rebanho ovino no país é superior a 17.000.000 de cabeças e a região Nordeste tem um efetivo correspondente a 58,5% de todos os ovinos criados no Brasil. A ovinocultura brasileira tem apresentado uma contínua expansão nos últimos anos. Isso demonstra a importância desta atividade e, conseqüentemente, sua contribuição para a composição do produto interno bruto do agronegócio brasileiro.

Vários pesquisadores (ELOY et al., 2011; PRADO et al., 2013; ANDUEZA et al., 2014) têm concentrado esforços no desenvolvimento de técnicas que permitam a máxima exploração do potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores. A sincronização de estros, a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), são exemplos de biotecnologias e utilizadas na produção de ovinos (SIMPLÍCIO et al., 2007).

Dentre as biotécnicas da reprodução desenvolvidas para a ovinocultura, a PIVE é a que apresenta maior potencial de produção de embriões de uma única doadora quando comparado IA e TE. Outras vantagens associadas a essa técnica incluem a possibilidade do uso de animais pré-púberes como doadores (VARAGO et al., 2009); produção de embriões de fêmeas valiosas que morreram ou que serão destinadas ao abate (TRALDI 2009) e desenvolvimento de pesquisas na área de transferência de nuclear e transgênese (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004).

Estudos efetuados com PIVE em ovinos resultaram em contribuições significativas para essa técnica, inclusive em outras espécies. No entanto, nesta espécie a PIVE ainda é realizada essencialmente em caráter experimental (BERNARDI, 2005). Apesar de ser uma biotécnica bastante eficiente, os mecanismos fisiológicos que permeiam essa biotécnica ainda necessitam ser melhor esclarecidos. Em ovinos, apenas 25 a 30% dos CCOs recuperados se desenvolvem em blastocistos quando cultivados *in vitro* (PTAK et al., 1999). Ainda de acordo com Rodriguez et al. (2006), o sucesso dessa biotecnologia depende, principalmente, da qualidade oocitária que está diretamente relacionada à presença das células do *cumulus* e às peculiaridades dos métodos de recuperação dos CCOs.

A limitação ainda existente nessa biotécnica pode ser parcialmente atribuída aos métodos de seleção dos CCOs, baseados exclusivamente em parâmetros morfológicos avaliados ao esteriomicroscópio, tais como a morfologia do ooplasma e do cumulus, o tamanho do folículo e do oócito, e o grau de atresia folicular (CALADO et al., 2005). Em termos práticos, sabe-se que CCOs com massa de cumulus compacta e constituída por numerosas camadas de células foliculares, e com um oócito de ooplasma homogêneo, apresentam maior capacidade de desenvolvimento, contrastando com os COCs de cumulus expandido e ooplasma heterogêneo (DE LOOS et al., 1991). No entanto, o processo de seleção de oócitos e de CCOs para utilização em diferentes áreas da reprodução apresenta dificuldades, atribuídas à escassez de informações acerca das características morfológicas que melhor reflitam a capacidade de desenvolvimento dos gametas (CALADO et al. 2005).

A utilização de critérios mais eficientes para avaliação nuclear e citoplasmática de CCOs pode auxiliar na seleção de complexos com maior competência para desenvolvimento embrionário. Para determinação desses critérios uma análise morfológica quantitativa se faz necessária para fornecer elementos fundamentais para elucidar acerca das características mais vantajosas dos CCOs (CALADO et al. 2005). Desse modo, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a estrutura de CCOs de ovelhas em diferentes fases do ciclo estral e em diferentes períodos da gestação.

2. OBJETIVOS

Caracterizar a estrutura de complexos cumulus oócitos (CCOs) de ovelhas nas diferentes fases do ciclo estral e da gestação.

Objetivos específicos:

- 1- Descrever a morfometria de CCOs de ovelhas nas fases do ciclo estral: diestro e proestro; e aos 30 e 60 dias de gestação.
2. Comparar características morfológicas de: oócitos e respectivos núcleos; células do *cumulus* e respectivos núcleos; espessura da zona pelúcida dos oócitos; população de células do *cumulus*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Foliculogênese e ovogênese

Nos mamíferos, a formação dos folículos ovarianos inicia-se ainda no período pré-natal e engloba os processos de ovogênese e foliculogênese (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). No processo de ovogênese as células germinativas primordiais povoam e proliferam na gônada feminina em desenvolvimento, essas células tornam-se rodeadas por células foliculares – células somáticas planas derivadas do epitélio superficial do ovariano em desenvolvimento. Isso transforma as células germinativas primordiais em oogônias que continuam a se proliferar, porém sem concluir a citocinese, deixando-os ligados uns aos outros por estreitas pontes citoplasmáticas (EPPIG et al., 2001).

A maioria das oogônias continuam a proliferação mitótica e algumas delas se diferenciam em oócitos primários. Essas últimas entram imediatamente na fase S do ciclo celular e, em seguida na prófase da meiose I. No entanto, essa proliferação é seguida por apoptose que conduz a mais oogônia e oócitos primários a serem reduzidos a apenas pequena população que se aloja próximo a superfície do ovário em desenvolvimento. Todos os oócitos primários remanescentes entram em prófase da meiose I quando se tornam detidos no estágio diplóteno ainda com o núcleo intacto (AERTS e BOLS, 2008). Circundados pelas células foliculares planas, esses oócitos formam os folículos primordiais. As células foliculares repousam sobre uma membrana basal que as separa das células do estroma que as cercam. Os folículos primordiais constituem o *pool* de folículos quiescentes de onde a fêmea vai recrutar-los para crescimento e ovulação durante sua vida reprodutiva (WANG e SUN, 2007; AERTS e BOLS, 2008).

O crescimento folicular ocorre quando os folículos são recrutados do *pool* primordial e se desenvolvem em folículos primários, secundários e terciários. Deve ser enfatizado que a grande maioria dos folículos que entram na fase de crescimento não conseguem concluí-la; esses são degenerados pelo processo de atresia e apenas uma minoria completa seu desenvolvimento à ponto de ovulação (LONERGAN et al.,

1994). No entanto, nenhum dos oócitos retoma a meiose antes do animal atingir a puberdade (CHOHAN e HUNTER, 2004).

Após a ativação do folículo primordial, as células foliculares começam a proliferar e formar uma monocamada de células cúbicas em volta do oócito para estabelecer o folículo primário. As células foliculares agora são referenciadas como células da granulosa. Com esta ativação, a fase de crescimento do oócito é iniciada (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Durante esse período, o oócito passa por muitas alterações morfológicas, incluindo o desenvolvimento de grânulos corticais no citoplasma. Além disso, pode tornar-se competente tanto para retomar a meiose quanto para sustentar o desenvolvimento embrionário após a fertilização (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; SHARMA et al., 2009).

As células da granulosa proliferam para formar várias camadas ao redor do oócito em que se torna conhecido com folículo secundário. O oócito e as células da granulosa que o envolvem sintetizam certas glicoproteínas que são depositadas entre si e as células da granulosa envolventes e formam a zona pelúcida (VAN WEZEL e RODGERS, 1996). Essa estrutura é atravessada por várias projeções que emergem das células da granulosa mais íntimas que, assim, mantém contato com o oócito por meio de junções *gap*. As células do estroma que rodeiam as células da granulosa se diferenciam em teca interna: uma camada de células produtoras de esteroides e em teca externa: formada por camadas concêntricas de células que tem função de apoio (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). As células esteroideogênicas da teca interna e as células da granulosa, são em conjunto responsáveis pela síntese de estradiol no folículo por meio de um sistema que envolve dois tipos células diferentes, as células da teca interna produzem andrógenos que são transportados para as células da granulosa onde são aromatizados em estrógenos (ROSSETTO et al., 2009).

Com o desenvolvimento contínuo, espaços cheios de líquido aparecem entre as células da granulosa e se aglutinam numa única cavidade, o antro, caracterizando o folículo terciário. Esses também são chamados folículos antrais (HULSHOF et al., 1994). Em paralelo com a expansão do antro, o oócito se torna localizado em uma saliência de células da granulosa, o *cumulus oophorus*, estendendo-se para o antro. As células da granulosa do *cumulus oophorus* são referidas com células do *cumulus*. À medida que o folículo se desenvolve, o mesmo acontece com o oócito até atingir sua estrutura característica (GINTHER et al., 2003). O processo de ovulação é

desencadeado pelo pico de LH pré-ovulatório. Esse processo pode ser referido como capacitação do oócito (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

3.2 Maturação e competência ovocitária

A maturação é uma série de processos que formam a aquisição de competência do oócito. Os oócitos interrompem seu ciclo meiótico na fase de prófase I, período que pode durar meses (peixes) ou anos (humanos), este tempo é necessário para o crescimento e reorganização citoplasmática do oócito antes da fecundação (SAGATA, 1998). A retomada da meiose e a etapa final da maturação do oócito ocorrem posterior ao crescimento e maturação citoplasmática e é desencadeado por diferentes estímulos que variam entre as espécies (TARAZONA, 2010).

A maturação folicular ocorre no interior do complexo folicular, o qual é composto de: oócito, células do *cumulus*, células da granulosa, células da teca e fluido (NILSSON e SKINNER, 2001; KALINOWSKI et al., 2004), as inter-relações entre esses componentes, tem evidenciado que a maturação do oócito é um processo complexo que envolve tanto o ciclo meiótico, como o reordenamento das organelas e componentes citoplasmáticos (FAIR, 2003). Estes eventos têm sido relacionados com a competência do oócito, conceito amplamente utilizado para distinguir os oócitos que são capazes de produzir um embrião viável e ser transferido após a fertilização (DURANTHON e RENARD, 2001).

3.2.1 Maturação citoplasmática

Durante a fase de crescimento, o oócito adquire organização citoplasmática que depende da expressão de genes e da multiplicação, modificação e redistribuição de organelas, além da modificação pós-transcricional de RNAm que irá ser acumulado para utilização posterior durante a clivagem do embrião (SMITH, 2001; TROUNSON et al., 2001). Durante o crescimento e maturação do oócito existem três pontos de controle importantes para a regulação do ciclo celular: o primeiro ocorre durante a fase G1 onde é monitorado o crescimento e tamanho celular; o segundo se dá na fase S; o terceiro ponto de controle é na fase G2, onde são reconhecidos danos ou anormalidades do fuso meiótico (TROUNSON et al., 2001). No entanto, quando o oócito reinicia a meiose o resultado final será duas divisões celulares consecutivas incompletas (corpos polares) sem voltar à fase S (GROSS et al., 2001).

O crescimento do oócito e a organização da zona pelúcida, dependem da comunicação intercelular com o cumulus, via junções *gap*, as quais permitem passagem de moléculas a partir do ambiente folicular até o oócito e vice-versa (FAIR, 2003) assim como pela liberação simultânea de glicoproteínas e outros fatores. A expressão coordenada dos genes que codificam as glicoproteínas ZP (ZP1, ZP2 e ZP3) está regulada pelo fator de linha germinal α , que por sua vez regula outros genes envolvidos na foliculogênese (SOYAL et al., 2000).

As três glicoproteínas da zona pelúcida são evolutivamente conservadas, mas sua organização entre as espécies são diferentes, o que confere a especificidade de reconhecimento do espermatozoide (PICTON et al., 1998). Simultaneamente com o início da formação da zona pelúcida e crescimento do oócito, o ooplasma sofre alteração na quantidade e distribuição de organelas e moléculas, permitindo-lhe manter o seu próprio desenvolvimento e acumular fatores para clivagens iniciais do embrião (PICTON et al., 1998), estes eventos podem ser estudados como conjunto de arranjos celulares e moleculares.

3.2.2 Maturação nuclear

A oogônia inicia a meiose durante o desenvolvimento fetal precoce, os oócitos progridem pelas fase de zigóteno, paquíteno e diplóteno, e são detidos neste ponto da prófase I (EPPIG, et al., 2001). A maturação nuclear é compreendida como o reinício da meiose que ocorre após a puberdade e é desencadeada por um pico do hormônio luteinizante (LH) pré-ovulatório.

Ao final do período de crescimento e antes do reinício da meiose, o núcleo do oócito se caracteriza por seu grande tamanho e coloração pálida e difusa com corantes como Hoechst, a este estado nuclear se conhece como vesícula germinativa (PICTON et al., 1998). Uma vez que o oócito atinge seu tamanho máximo, retoma o processo que ao término se denomina competência meiótica (DE VANTERY et al., 1997), e ocorre durante três etapas: 1- quebra da vesícula germinativa que se inicia com a fosforilação da lâmina nuclear a dissolução do nucléolo (SMITH, 2001), 2- progresso para metáfase I e expulsão do primeiro corpúsculo polar e 3-continuação da metáfase II da meiose II para atingir o estado haploide, no momento do contato do espermatozoide e o oócito é expelido o segundo corpúsculo polar (SUN e NAGAI, 2003; RODRIGUEZ e FARIN, 2004)

3.3 Parâmetros utilizados como indicativo de competência ovocitária

Na prática, um dos parâmetros mais utilizados e conhecidos para selecionar oócitos que possuem maior potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário é baseado na morfologia do complexo *cumulus*-oócito. Tem sido mostrado que existe uma relação entre a aparência das células do *cumulus* e citoplasma do oócito, com a sua capacidade de produção embrionária *in vitro* (CAIXETA e DODE, 2010). Morfológicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo com granulações finas, coloração marrom e estar completamente envolvidos com várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta. A maioria dos autores descreve quatro categorias de CCOs, sendo o grau 1 aqueles CCOs com *cumulus* compacto, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Os CCOs de grau 2 apresentam citoplasma com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e *cumulus* compacto menor do que na categoria 1, mas com pelo menos cinco camadas completas. Já o grau 3, compreende um oócito com *cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, degenerado, vacuolizado, ou fragmentado, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida. O de grau 4 apresenta oócito desnudo sem *cumulus* (STOJKOVIC et al., 2001; LEIBFRIED e FIRST 1979). Os CCOs classificados como grau 1 são considerados os mais competentes para o desenvolvimento embrionário e os CCOs grau 4, os menos competentes para a produção *in vitro* de embriões (PUJOL et al., 2004).

Recentemente foi testado com sucesso outro método para a seleção de oócitos de competência superior, trata-se do corante *brilliant cresyl blue* (BCB) (WANG et al., 2007), o qual também já tem sido testado e utilizado em oócitos de outras espécies (GHANEM et al., 2007). O BCB é um corante vital azul que determina a atividade intracelular da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima sintetizada durante a fase de crescimento do oócito, mas apresentou decréscimo da atividade em oócitos completamente crescidos (RODRÍGUEZ-GONZÁLES et al., 2002; BHOJWANI et al., 2007). Essa enzima é de importância fundamental no fornecimento de energia para a síntese de nucleotídeos e formação de ácidos graxos. Podendo ser BCB+ caso o citoplasma apresente coloração azulada, a qual indica baixa atividade da G6PD que pode degradar o BCB. No BCB- se observa o citoplasma sem coloração,

que indica uma alta capacidade da G6PD ser degradada pelo BCB (SANTIAGO, 2012).

Para a maioria dos autores o teste BCB é uma forma eficaz para selecionar oócitos mais competentes para a produção *in vitro* (RODRÍGUEZ-GONZÁLES, et al., 2002; PUJOL, et al., 2004; TORNER, et al., 2008), mas que a competência dos oócitos BCB positivo pode variar com o diâmetro do oócito, maturidade sexual e estimulação com gonadotrofinas (WU, et al., 2007).

O tamanho do folículo também tem sido um método utilizado para estimar oócitos de maior competência. De acordo com Rodríguez et al. (2006) oócitos provenientes de folículos maiores têm maior potencial de desenvolvimento que os de folículos menores, pois o tamanho do folículo está diretamente relacionado ao diâmetro do oócito, sendo que oócitos de maior diâmetro apresentam maior potencial de desenvolvimento em blastocistos devido ao acúmulo de RNA mensageiro (mRNA) e de proteínas (LAZZARI et al., 1994).

Finalmente, tem sido relatado que oócitos de animais pré-púberes são menos competentes para o desenvolvimento comparado com fêmeas adultas (REVEL et al., 1995; SALAMONE et al., 2001). Essa redução na competência de oócitos de fêmeas pré-púberes pode ser em parte, atribuído ao menor tamanho do oócito, diferenças na síntese protéica e metabolismo energético, atraso na migração das organelas citoplasmáticas e redução da atividade de algumas enzimas (PUJOL et al., 2004).

3.4 Funções das células do cumulus

As células do cumulus (CCs) são originárias das células da granulosa (CGs) relativamente indiferenciadas. As CGs são o tipo de célula primária no ovário que fornece o apoio físico e microambiente necessário para o desenvolvimento do oócito. O início da diferenciação das CGs ocorre durante a formação do antro folicular, o que corresponde, aproximadamente, à fase de crescimento do oócito. As CCs, na maioria dos mamíferos, possuem duas distintas linhagens anatômicas e funcionais: CGs mural que revestem a parede do folículos, aos quais possuem a esteroidogênese como principal função; e as CCs que circundam o oócito (CHIAN et al., 2004; GILCHRIST et al., 2008).

A interação oócito-células da granulosa mediada por sinais parácrinos e/ou por comunicações via junções gap, durante os estágios iniciais de desenvolvimento do oócito determina a taxa de crescimento folicular e diferenciação. Além disso, após a

diferenciação, a interação célula do cumulus-oócito é essencial para promover a maturação nuclear e citoplasmática, que determina a capacidade do oócito para suportar o desenvolvimento embrionário inicial (EPPIG, 2001; DE LA FUENTE 2001).

A interação oócito-células da granulosa é essencial antes e depois do pico de LH. Antes do pico de LH, oócitos não apenas influenciam na proliferação das células da granulosa (ZUCCOTTI et al., 1998) e diferenciação (DIAZ et al., 2007), mas também regulam a atividade metabólica das células do cumulus dentro dos CCOs (captação de aminoácidos, glicólise e biossíntese de colesterol; SUGIURA 2005). Após o pico de LH, oócitos regulam a expressão de genes da CCs responsáveis pelo processo de expansão (SÁNCHEZ e SMITZ, 2012).

Sinais parácrinos mediados por fatores secretados por oócitos são, provavelmente, entre os mecanismos mais importantes, mas não únicos, mediando interação entre oócito-células do *cumulus*. As junções *gap* são conexões intercelular altamente especializadas que facilitam a comunicação entre o oócito e as células do cumulus que o envolve. Notoriamente, uma vez que os oócitos e as células do cumulus são fisicamente separadas pela zona pelúcida, a comunicação com as junções *gap* podem ocorrer graças a projeções citoplasmáticas desenvolvidas pelas células do cumulus. Essas projeções são capazes de penetrar pela zona pelúcida atingindo a membrana do oócito (ALBERTINI, 2001). As junções *gap* desempenham um papel crucial na comunicação bidirecional entre oócitos e células do cumulus, que permite a passagem de moléculas de diferentes tipos (aminoácidos e seus metabólitos, tais como o piruvato) a partir do cumulus para o oócito (HUANG e WELLS, 2010).

Tem sido demonstrado que oócitos cooperam em mais do que um processo metabólico. Por exemplo, oócitos por si próprios, não são capazes de metabolizar a glicose, enquanto as células do *cumulus* são muito eficientes em fazer isso (SUGIURA et al., 2005). Além disso, como os oócitos requerem produtos obtidos do processo de metabolismo como fonte para o seu crescimento e maturação, as células do cumulus surgem para metabolizar a glicose para os oócitos (BIGGERS et al., 1976). Uma cooperação metabólica semelhante parece existir entre oócitos e as células do cumulus que diz respeito à biossíntese do colesterol (COMISKEY e WARNER, 2007).

Após a ovulação, as CCs continuam aderidas ao oócito, facilitando a captação do CCO pelas células epiteliais ciliadas do infundíbulo e o seu transporte ao longo do oviduto (TANGHE et al., 2002). Em bovinos, esse processo tem mostrado ser mediado

pela adesão das células do cumulus e sua matriz inter-celular e as células do epitélio do oviduto (KÖLLE et al., 2009). Em seres humanos, a matriz do cumulus e as células do cumulus participam da fertilização influenciando a ligação dos espermatozoides e penetração no CCO (CHUNG et al., 2009; HONG et al., 2009). Posteriormente, o íntimo contato entre as células do cumulus é desfeita (HUANG e WELLS, 2010).

Tem sido observado que a taxa de apoptose em CCs humanos oriundos de oócitos morfológicamente anormais foram significativamente maiores do que em oócitos morfológicamente normais examinados sob microscopia eletrônica de transmissão (YANG et al., 2009). Um aumento na taxa de CCs com apoptose também tem sido associada com a imaturidade de oócitos humanos, a fertilização comprometida (HOST et al., 2002), ao desenvolvimento de blastocistos abaixo do ideal (CORN et al., 2005) e a pobres resultados em programas de fertilização in vitro (OOSTERHUIS et al., 1998). Ainda não está claro se oócitos de má qualidade induzem a apoptose nas CCs ou se a grande proporção apoptose nas CCs levam à prejudicar a qualidade dos oócitos (HUANG E WELLS, 2010). No entanto, estas observações demonstram a interdependência entre o oócito e as CCs e sugerem que o funcionamento adequado das CCs é essencial para garantir a sobrevivência e consequente maturação do oócito, permitindo-lhe que cumpra a sua finalidade no processo reprodutivo (TANGHE et al., 2002).

4. REFERÊNCIAS

AERTS J.M.J.; BOLS P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development.

Reproduction in Domestic Animal, v.45, p.171-179, 2008.

ALBERTINI D.F.; COMBELLES C.M.; BENECCHI E.; CARABATSOS M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. v. 121, p. 647–653, 2001.

ANDUEZA D. ALABART J.L.; LAHOZ B.; LAHOZ F.X.; FOLCH J. Early pregnancy diagnosis in sheep using near-infrared spectroscopy on blood plasma. **Theriogenology**. v. 81, p. 509-513, 2014.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies in goats. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.255-266, 2004.

BERNARDI M. L. Produção in vitro de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33: p.1-16. 2005.

BHOJWANI S.; ALM H.; TORNER H.; KANITZ W.; POEHLAND R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. **Theriogenology**. v.67, p.341-345, 2007.

BIGGERS J.D.; WHITTINGHAM D.G.; DONAHUE R.P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.58 p.560–567, 1967.

CALADO A.M., ROCHA E., COLAÇO A., SOUSA M. Estudo estereológico comparativo de complexos cumulus-oócito aspirados de folículos durante o ciclo estral em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57, p.465-475. 2005.

CHIAN R.C.; LIM J.H.; TAN S.L. State of the art in vitro oocyte maturation.

Obstet Gynecol. v.16 p.211–219, 2004.

CHOHAN K.R.; HUNTER A.G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. **Theriogenology**, v.61, p.373-380, 2004.

CHUNG M.K.; CHIU P.C.N.; LEE C.L.; PANG R.T.; EHY N.G.; LEE K.F.; KOISTINEN R.; KOISTINEN H.; SEPPALA M.; YEUNG W.S.B. Cumulus-associated alpha2-macroglobulin derivative retains pro-conceptive glycodelin-C in the human cumulus matrix. **Hum Reprod** v.24, p.2856–2867, 2009.

COMISKEY M.; WARNER C.M. Spatio-temporal localization of membrane lipid rafts in mouse oocytes and cleaving preimplantation embryos, **Dev. Biol.** v.303, p.727–739. 2007.

CORN C.M.; HAUSER-KRONBERGER C.; MOSER M.; TEWS G.; EBNER T. Predictive value of cumulus cells apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. **Fertil Steril.** v.84, p.627–633, 2005.

DE LA FUENTE R.; EPPIG J.J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling, **Dev. Biol.** v.229, p.224–236, 2001.

DE LOOS F.; KASTROP P.; VAN MAURIK P. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development.* v.28, p.255-259, 1991.

DE VANTERY C, STUTZ A, VASSALLI JD, SCHORDERET-SLATKINE SET. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. **Dev Biol.** v.1871, p.43-54, 1997.

DIAZ F.J.; WIGGLESWORTH K., EPPIG J.J., Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. **J. Cell Sci.** v.120, p.1330–1340, 2007.

DURANTHON V, RENARD JP. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**.v.556, p.1277-1289, 2001.

ELOY, A. M. X. ; SOUZA P. H. F.; SIMPLICIO, A. A.; Atividade ovariana pós-parto em ovelhas Santa Inês sob diferentes manejos de amamentação na região semiárida do Nordeste. **Revista Brasileira de Saúde e Produção**. v. 12, p. 970-983, 2011.

EPPIG, J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829-838, 2001.

FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim Reprod Sci**. v.783, p.203-216, 2003.

GHANEM N.; HÖLKER M.; RINGS F.; JENNEN D.; THOLEN E.; SIRARD M.A. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **Development Biology**. v.7, p.1-19. 2007

GILCHRIST R.B.; THOMPSON J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology** v.67, p.6–15, 2007.

GINTHER O.J.; BEG M.A.; KOT K.; MEIRA C.; BERGFELT D.R. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.524-529, 2003.

GROSS SD, LEWELLYN AL, MALLER JL. A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in *Xenopus* oocytes. **J Biol Chem**. v.276, p.460-468. 2001.

HONG S.J.; CHIU P.; LEE K.F.; TSE J. HO P.C.; YEUNG W. Cumulus cells and their

extracellular matrix affect the quality of the spermatozoa penetrating the cumulus mass. **Fertil Steril**; v.92, p.971–978, 2009.

HOST E.; GABRIELSEN A.; LINDENBERG S.; SMIDT-JENSEN S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. **Fertil Steril** v.77, p.511–515, 2002.

HUANG Z.; WELLS D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. **Molecular Human Reproduction**, v.16, n.10, p. 715–725, 2010.

HULSHOF S.C.J.; FIGUEIREDO J.R.; BECKERS J.B. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Quart Journal Veterinary Science**, v.16, p.78-80, 1994.

IBGE- **Censo Agropecuário** 2010. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab17.pdf> Acesso em: 2014.

KALINOWSKI RR, BERLOT CH, JONES TL, ROSS LF, JAFFE LA, MEHLMANN L. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. **Development Biology**. v.267, p.11-13, 2004.

KÖLLE S.; DUBIELZIG S.; REESE S.; WEHREND A.; KÖNIG P.; KUMMER W. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. **Biol Reprod** v.81, p.267–274, 2009.

LAZZARI G. Functional changes in the somatic and germinal compartments during follicle growth in pigs. **Animal Reproduction Science**. v.35, p.119-130, 1994.

LEIBFRIED L.; FIRST N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**. v. 48, p.76–86, 1979.

LONERGAN P.; MONAGHAN P.; RIZOS D.; BOLAND M.P.; GORDON I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

NILSSON E, SKINNER MK. Cellular interactions that control primordial follicle development y folliculogenesis. **J Soc Gynecol Investig**. v.81, p.17-20, 2001.

OOSTERHUIS G.J.E.; MICHGELSEN H.W.; LAMBALK C.B.; SCHOEMAKER J.; VERMES I. Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. **Fertil Steril**. v.70, p.747-749, 1998.

PICTON H, BRIGGS D, GOSDEN R. The molecular basis of oocyte growth y development. **Mol Cell Endocrinol**. v.1451, p.27-37, 1998.

PRADO O.R.; BASTOS G.M.; MONTEIRO A.L.G.; SAAB B.B.; GILAVERTE S.; PIEROBOM C.C.; HENTZ F.; MARTINS L.H.S.; SILVA C.J.A.; DRANCA G.S.; STIVARI T.S.S.; CERQUEIRA G. Adição de plasma seminal ao sêmen descongelado e taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 65, 2013.

PTAK G. DATTENA M. LOI P. TISCHNER M. CAPPAL P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**. v.52, p.1105-1114. 1999.

PUJOL M.; LÓPEZ-BÉJAR M.; PARAMIO M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**. v.61, p.735-744, 2004.

REVEL F.; MERMILLOD P.; PEYNOT N.; RENARD J.P.; HEYMAN Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.103, p.115-120, 1995.

RODRÍGUEZ C., ANEL L., ALVAREZ M., ANEL E., BOIXO J. C., CHAMORRO C.A. & PAZ P. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. **Reproduction in Domestic Animal**. v.41, p.106-113, 2006.

RODRÍGUEZ-GONZÁLES E.; LÓPEZ-BÉJAR M.; VELILLA E.; PARAMIO M.T. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**. v.57, p.1397-1409, 2002.

RODRIGUEZ KF, FARIN CE. Gene transcription y regulation of oocyte maturation. **Reproduction Fertility and Development**. v.161, p.55-67, 2004.

ROSSETTO R.; LIMA-VERDE I.B.; MATOS M.H.T.; SARAIVA M.V.A; MARTINS F.S.; FAUSTINO L.R.; ARAÚJO V.R; SILVA C.M.G.; NAME K.P.O.; BÁO S.N.; CAMPELLO C.C.; FIGUEIREDO J.R.; BLUME H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.37, p.112-123, 2009.

SAGATA N. Introduction: meiotic maturation y arrest in animal oocytes. **Semin Cell Dev Biol**. v.95, p.535-537. 1998.

SALAMONE D.F.; DAMIANI P.; FISSORE R.A.; ROBL J.M.; DUBY R.T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biology Reproduction**. v.64, p.1761–1768, 2001.

SÁNCHEZ F.; SMITZ J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. v.12, p. 1896-1912, 2012.

SANTIAGO F. C. **Evaluación de Ovocitos Ovinos por Microscopia de Luz Polarizada**. Universidad de Oviedo - Oviedo – Asturian – España. 2012. 35 p. Dissertação (Mestrado em Biología y Tecnología de la Reproducción).

SHARMA G.T.; DUBEY P.K.; MEUR S.K. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. **Livest Science**, v.123, p.300-305, 2009.

SIMPLÍCIO A.A.; FREITAS V.J.F.; FONSECA J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, p.234-246, 2007.

SMITH GD. *In vitro* maturation of oocytes. *Curr Womens Health Rep*. v.12, p.143-151, 2001.

SOYAL SM, AMLEH A, DEAN J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**. v.127, p.4645-4654, 2000.

STOJKOVIC M., MACHADO A.S.; STOJKOVIC P.; ZAKHARTCHENKO V.; HUTZLER P.; GONÇALVES P.B. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology Reproductive.**; v.64, p.904-909, 2001.

SUGIURA K., F.L. PENDOLA, J.J. EPPIG, Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism, **Dev. Biol.** v.279, p.20–30, 2005.

SUN Q.Y.; NAGAI T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation y fertilization. **J Reprod Dev**. v.495, p.347-359, 2003.

TANGHE S.; SOOM A.V.; NAUWYNCK H.; MARC C.; DE KRUIF. A Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilisation. **Mol Reprod Dev**. v.61 p.414–424, 2002.

TARAZONA A.; LÓPEZ A.; OLIVERA-ANGEL M. La competencia del ovocito: Qué, Cómo y Cuándo. **Acta Biologica Colombiana**. v.15, p.3 – 18, 2010.

TORNER H, GHANEM N, AMBROS C, HOLKER M, TOMEK W, PHATSARA C. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**. v.135, p.197- 212, 2008.

TRALDI A.S. Produção *in vitro* de embriões de ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, p.301-306, 2009.

TROUNSON A, YERIESZ C, JONES G. Maturation of human oocytes *in vitro* y their developmental competence. **Reproduction**.;v.121, p.51-75, 2001.

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

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.

VARAGO, F.C.; MENDONCA, L.F.; MOUSTACAS, V.S.; CRUZ, B.C.; CARVALHO, B.C.; LAGARES, M.A. Biotécnicas da reprodução aplicadas a pequenos ruminantes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1-17, 2009.

WANG Q.; SUN Y.Q. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction of Fertility and Development**, v.19, p.1-12, 2007.

WU Y.G.; LIU Y.; ZHOU P.; LAN D.; MIAO D.Q.; TAN J.H. Selection of oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining a study using the mouse model. **Cell Res**. v.17, p.722-731, 2007.

YANG Y.J.; ZHANG Y.J.; YUAN L. Ultrastructure of human oocytes of different

maturity stages and the alteration during in vitro maturation. **Fertil Steril.** v.92, p.396 - 402. 2009.

ZUCCOTTI M., P.G. ROSSI, A. MARTINEZ, S. GARAGNA, A. FORABOSCO, REDI C.A. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes, **Biol. Reprod.** v.58, p.700–704, 1998.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

**Estudo morfológico de complexo *cumulus oophorus* ovinos obtidos de folículos antrais
em diferentes fase do ciclo estral e da gestação**

(Submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

Estudo morfológico de complexo cumulus oócitos ovinos obtidos de folículos antrais em diferentes fase do ciclo estral e da gestação

Marquiliano F. Moura², José N. S. Sales³ e Cláudio C. Bartolomeu²

Abstract Moura M.F.², Sales J. N. S. ³ & Bartolomeu C. C.² 2014. [Morphological study of ovine oocyte cumulus complex of antral follicles in different phase of the estrous cycle and pregnancy.] Estudo morfológico de complexo *cumulus oophorus* ovinos obtidos de folículos antrais em diferentes fase do ciclo estral e da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Mundaú, Garanhuns, PE 55296-901, Brasil, Email: marquiliano@hotmail.com

It was carried out a morphological study on Oocyte *Cumulus* Complex of sheep (COCs), in order to characterize them quantitatively, both during the proestrus and diameter phases of the estrous cycle, as during different periods of the gestation. COCs were collected from antral follicles (3-6 mm) with regular, slightly grainy and multiple layers of *cumulus* cytoplasm (COC Grade I) fixed on glutaraldehyde and embedded in paraffin, as well as sectioned into sections of 5 µm. The principle of the nucleator was used to estimate average volumes of oocytes, *cumulus* cells and their nuclei. The thicknesses of the pellucida zone, as well as the numerical percentages of different types of *cumulus* cells were evaluated. There was a synchronous increase of the volume of the oocyte and its nucleus from diestrus to proestrus phases. Concerning the ones collected in the gestation stages, there was a parameter volume reduction as the pregnancy progresses. The thickness of the pellucida zone was reduced during the periods approaching ovulation. Three types of *cumulus* cells were observed (C1-C3). The results suggest that *cumulus* cells respond to circulating hormone levels during the *estrous cycle* and gestation.

INDEX TERMS: ovarian follicles, oestrous cycle, granulosa cells

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Mundaú, Garanhuns, PE 55296-901, Brasil.

³ Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), PB 079, Km 12, Areia – PB, CEP 58.397-000

RESUMO - Um estudo morfológico foi realizado em complexos *cumulus oophorus* de ovinos (CCOs), a fim de caracterizá-los durante as fases de proestro e diestro do ciclo estral, e durante diferentes períodos de gestação. CCOs foram colhidos a partir de folículos antrais (3-6 mm) com citoplasma regular, levemente granulado e com múltiplas camadas de células do cúmulus (CCO Grau I). Fixados em glutaraldeído e incluso em parafina, e seccionado em cortes de 5 µm. O volume médio dos oócitos com e sem zona pelúcida foram maiores nas fases de proestro, havendo redução desses volumes nas fases de diestro, G30 e G60, respectivamente. No entanto, foi observado que na fase de proestro o volume do núcleo foi inferior quando comparado aos núcleos das fases de diestro, G30 e G60. Já a zona pelúcida apresentou-se mais delgada à medida que no volume do oócito aumentou. As células do *cumulus* e seus respectivos núcleos mantiveram os volumes inalterados durante todas as fases estudadas. Houve diferença significativa quando comparado o volume dos tipos de células do *cumulus* em todas as fases. Também foram observados e classificados vários tipos (C1, C2 e C3) de células do *cumulus*, na fase de proestro houve uma maior proporção de células do tipo C3, seguido de significativa redução desse tipo de célula nas fases de diestro, G30 e G60. Já o tipo de célula C1 e C2 foram mais frequentes no grupo G60. Conclui-se que a morfologia das células do *cumulus*, da zona pelúcida, do citoplasma e do núcleo de complexo *cumulus oophorus* de folículos antrais ovinos apresenta-se morfológicamente distinta de acordo com as fases do ciclo estral e gestação.

Termos de indexação: folículos ovarianos, ciclo estral, células da granulosa.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura foi uma das primeiras culturas pecuárias a ser introduzida pelos colonizadores portugueses. Segundo o IBGE (2010), o efetivo do rebanho ovino no país é superior a 17.000.000 de cabeças e a região Nordeste tem um efetivo correspondente a 58,5% de todos os ovinos criados no Brasil. A ovinocultura brasileira tem apresentado uma contínua expansão nos últimos anos. Isso demonstra a importância desta atividade e, conseqüentemente, sua contribuição para a composição do produto interno bruto do agronegócio brasileiro.

Vários pesquisadores (ELOY et al., 2011; PRADO et al., 2013; ANDUEZA et al., 2014) têm concentrado esforços no desenvolvimento de técnicas que permitam a máxima exploração do potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores. A sincronização de estros, a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), são exemplos de biotecnologias e utilizadas na produção de ovinos (SIMPLÍCIO et al., 2007).

Dentre as biotécnicas da reprodução desenvolvidas para a ovinocultura, a PIVE é a que apresenta maior potencial de produção de embriões de uma única doadora quando comparado IA e TE. Outras vantagens associadas a essa técnica incluem a possibilidade do uso de animais pré-púberes como doadores (VARAGO et al., 2009); produção de embriões de fêmeas valiosas que morreram ou que serão destinadas ao abate (TRALDI 2009) e desenvolvimento de pesquisas na área de transferência de nuclear e transgênese (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004).

Estudos efetuados com PIVE em ovinos resultaram em contribuições significativas para essa técnica, inclusive em outras espécies. No entanto, nesta espécie a PIVE ainda é realizada essencialmente em caráter experimental (BERNARDI, 2005). Apesar de ser uma biotécnica bastante eficiente, os mecanismos

fisiológicos que permeiam essa biotécnica ainda necessitam ser melhor esclarecidos. Em ovinos, apenas 25 a 30% dos CCOs recuperados se desenvolvem em blastocistos quando cultivados *in vitro* (PTAK et al., 1999). Ainda de acordo com Rodriguez et al. (2006), o sucesso dessa biotecnologia depende, principalmente, da qualidade oocitária que está diretamente relacionada à presença das células do *cumulus* e às peculiaridades dos métodos de recuperação dos CCOs.

A limitação ainda existente nessa biotécnica pode ser parcialmente atribuída aos métodos de seleção dos CCOs, baseados exclusivamente em parâmetros morfológicos avaliados ao esteriomicroscópio, tais como a morfologia do ooplasma e do cumulus, o tamanho do folículo e do oócito, e o grau de atresia folicular (CALADO et al., 2005). Em termos práticos, sabe-se que CCOs com massa de cumulus compacta e constituída por numerosas camadas de células foliculares, e com um oócito de ooplasma homogêneo, apresentam maior capacidade de desenvolvimento, contrastando com os COCs de cumulus expandido e ooplasma heterogêneo (DE LOOS et al., 1991). No entanto, o processo de seleção de oócitos e de CCOs para utilização em diferentes áreas da reprodução apresenta dificuldades, atribuídas à escassez de informações acerca das características morfológicas que melhor reflitam a capacidade de desenvolvimento dos gametas (CALADO et al. 2005).

A utilização de critérios mais eficientes para avaliação nuclear e citoplasmática de CCOs pode auxiliar na seleção de complexos com maior competência para desenvolvimento embrionário. Para determinação desses critérios uma análise morfológica quantitativa se faz necessária para fornecer elementos fundamentais para elucidar acerca das características mais vantajosas dos CCOs (CALADO et al. 2005). Desse modo, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a estrutura de CCOs de ovelhas em diferentes fases do ciclo estral e em diferentes períodos da gestação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Oito ovelhas da raça Santa Inês foram mantidas em baias coletivas, recebendo alimentação a base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), suplementação balanceada com farelo de soja, farelo de milho, sal mineral e água *ad libitum* por período de 130 dias. Essas tiveram o ciclo estral sincronizado com protocolo para inseminação artificial em tempo fixo o qual consistiu na inserção do dispositivo intravaginal e administração de 300 UI de gonadotrofina coriônica equina - Dia 0; retirada do dispositivo e administração de 300 UI de gonadotrofina coriônica equina - Dia 12. Posteriormente, foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos (proestro; n=4-; e diestro; n=4). A partir do dia da retirada do dispositivo, as ovelhas tiveram o ciclo estral monitorado por meio de ultra-som. O dia do proestro foi determinado pela regressão do corpo lúteo e presença de folículo > 4,5mm, a ovulação definida após o desaparecimento do maior folículo e a fase de proestro foi considerada sete dias após o surgimento do corpo lúteo. Em um abatedouro, 20 pares de ovários foram colhidos de ovelhas abatidas com período de gestação estimado, por meio do comprimento crânio caudal, em 30 (G30; n=10) e 60 dias de gestação (G60; n=60), de acordo com metodologia utilizada por Cloete, 1939.

Os ovários colhidos foram transportados, em solução salina, contendo penicilina/estreptomicina 1%, a uma temperatura de 37° C, no intervalo máximo de duas horas os quais foram analisados no Laboratório de Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Os CCOs foram obtidos após microdissecção dos folículos de acordo com metodologia descrita por Caixeta e Dode (2008). Os folículos foram mensurados com paquímetro digital e selecionados os que possuíam diâmetro entre 3 a 6 mm. Com

auxílio de uma lupa estereoscópica, os oócitos foram analisados e classificados; e selecionados os que apresentavam citoplasma regular, levemente granulado e múltiplas camadas de células do cúmulo (CCO Grau I) (Baldassarre et al, 2002; Cognié et al.,2004).

Os CCOs selecionados foram fixados em glutaraldeído 4%, lavados em solução salina tamponada por 20 minutos. Em seguida foram corados com Azul de Metileno (1%) por 15 minutos (com finalidade de marcar o CCO), desidratados (álcool 70° por 30 min, álcool 90° por 30min, álcool 100° por 30 min), clareados (xilol I por 15 min, xilol II por 15 min) e inclusos em parafina. Os CCOs foram completamente fatiados em cortes de 5 µm e corados em Eosina e Hematoxilina. Os CCOs mensurados por um microscópio de luz (Zeiss) conectado a um computador com o *software* Motic Imagens Plus 2.0.

Os parâmetros analisados foram os volumes médios de: oócito, com e sem zona pelúcida; núcleo dos oócitos; células do cumulus e núcleos das células do cumulus. Três tipos de células morfológicamente distintas foram identificadas nas fases do ciclo estral e nos períodos de gestação: células tipo C1 apresentaram núcleo pequeno, células tipo C3 núcleos grandes e células tipo C2 tinham tamanho intermediário. Também foi obtida a relação de porcentagem numérica relativa dos vários tipos morfológicos de células do cumulus. Para o cálculo de distribuição do percentual dos diferentes tipos de células do cumulus, foram selecionados aleatoriamente quatro campos distintos em cada complexo (Tabela 1).

A espessura da zona pelúcida foi estimada por medidas lineares diretas em uma seção perpendicular. Nesta seção, quatro medidas foram feitas em regiões diretamente opostas. Os volumes médios dos oócitos e das células do cumulus foram estimados a partir da seguinte fórmula: $V = 4/3 \cdot \pi \cdot r^3$. Onde V é o volume médio da esfera, r é o raio e π é a constante. Para a correção da retração celular foram mensurados 10 oócitos antes e após o procedimento de inclusão em parafina. O índice de +7,3% foi encontrado e aplicado para corrigir a retração.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (proestro, diestro, 30 e 60 dias de gestação). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias de tratamento comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Sob análise ao estereoscópio, a maioria dos CCOs selecionados apresentaram a massa de cumulus arredondada, com o oócito no centro. No entanto, alguns complexos, apresentaram formato irregular com oócito sendo localizado em posição central ou em posição mais excêntrica. Na microscopia de luz, os oócitos mostraram uma superfície circular regular com o ooplasma sendo homogeneamente preenchido com aglomerados escuros e claros. Quando presente, o núcleo estava excêntrico, redondo e oval, com contornos. A zona pelúcida estava bem delimitada contornando o ooplasma e apresentou uma faixa regular de única coloração.

Nas ovelhas do grupo proestro foram recuperados 20 CCOs, destes, 17 apresentaram o núcleo evidente. Nas ovelhas do grupo diestro foram recuperados 20 CCOs, sendo que em 5 o núcleo estava ausente. Nas ovelhas do grupo G30, foram recuperados 20 CCOs sendo que em 2 o núcleo estava ausente. Já nas ovelhas do grupo G60 todos os 20 CCOs recuperados apresentaram núcleo evidente.

O volume médio dos oócitos com e sem zona pelúcida foram maiores nas fases de proestro, havendo redução desses volumes nas fases de diestro, G30 e G60, respectivamente (Tabela 2). No entanto, foi observado que na fase de proestro o volume do núcleo foi inferior quando comparado aos núcleos das fases de diestro, G30

e G60, respectivamente. Já a zona pelúcida apresentou-se mais delgada à medida que no volume do oócito aumentou.

As células do *cumulus* e seus respectivos núcleos mantiveram os volumes inalterados durante todas as fases estudadas. No entanto, houve diferença significativa quando comparado o volume dos tipos de células do *cumulus* em todas as fases. Em relação à porcentagem dos diferentes tipos de células do *cumulus*, foi observado que na fase de proestro há uma maior proporção de células do tipo C3, seguido de significativa redução desse tipo de célula nas fases de diestro, G30 e G60. Já o tipo de célula C1 e C2 foram mais frequentes no grupo G60.

DISCUSSÃO

A colheita de CCOs para produção *in vitro* de embriões ovinos é possível ocorrer a partir de fêmeas nas quais os procedimentos convencionais de produção e transferência de embriões não são aplicáveis, como é o caso de fêmeas pré-púberes, fêmeas com infertilidade temporária ou irreversível, e gestantes (Baldassare et al., 1996; Kühholzer et al., 1997). Diferenças estruturais consideráveis podem existir nas amostras aparentemente homogêneas de CCOs de mamíferos usado para ensaios *in vitro* e aplicações clínicas. Se verdadeiras, as diferenças que passam despercebido sob observação podem ser demonstrada por análises diretas mais eficientes (Bagger et al., 1989). Espera-se que a avaliação quantitativa do presente estudo possa oferecer explicação básica para o comportamento consideravelmente contraditório de desenvolvimento de CCO, e guie a uma melhor seleção de CCOs, melhorando assim, as taxas de sucesso de maturação *in vitro* e fertilização.

Uma proporção relativamente alta de oócitos não exibiram núcleo ao corte: 17,1% em proestro, 12,3% em diestro, 10% em G30 e 20,9% em G60. Uma descoberta semelhante foi observada em CCOs de grau 1 aspirados de pequenos folículos antrais (1-4 mm) bovinos (Calado et al., 2001, 2003a, 2003b). Outros autores também encontraram altas taxas de oócitos sem núcleo de folículos antrais bovinos (Leibfried e First, 1979; Hyttel et al., 1986). A ausência de núcleo pode sugerir oócito degenerado. No entanto, os CCOs foram aqui selecionados com base em categorias morfológicas que excluem complexos atrésicos e/ou em degeneração. Portanto, é possível que tais núcleos não tenham sido observados devido estarem na fase de prometáfase.

Embora os CCOs ovinos tenham sido coletados usando os mesmos critérios em relação ao tamanho dos folículos, e com todos os CCOs selecionados inseridos na mesma categoria (grau 1) folículos antrais colhidos na fase de proestro tiveram o volume do oócitos maiores que os colhidos em diestro, G30 e G60. Segundo Lazzari et al. (1994), oócitos de maior diâmetro apresentam maior potencial de desenvolvimento em blastocisto devido o acúmulo de RNA mensageiro e de proteínas. Entre os parâmetros analisados nos CCOs, a variabilidade foi bastante elevada, havendo mudanças nos volumes de oócitos com e sem zona pelúcida, durante as fases de proestro e diestro, assim como em G30 e G60. Achados semelhantes foram verificados em CCOs aspirados de pequenos e médios folículos antrais bovinos nas fases de proestro e diestro (Calado et al., 2001, 2003, 2003b) e em microdissecção folicular de ovários de ratos (Bagger, 1993). Em comparação ao volume dos núcleos dos oócitos, foram semelhantes apenas entre CCOs colhidos em diestro e G30, enquanto houve diferenças entre proestro, diestro + G30 e G60. Estes dados sugerem que o aumento do volume do oócito e do núcleo do oócito ovinos é sincrônico em CCOs de folículos antrais (> 3 mm). Esses dados diferem dos observados por Calado e colaboradores (2003b) em folículos antrais bovinos de tamanho médio (5-7mm) perceberam que até um

determinado tamanho do folículo o aumento de volume do oócito não é sincronizado com a expansão contínua do núcleo do oócito. Porém, após atingir um limiar é conseguido, tanto o núcleo como o oócito se expandem em harmonia. Assim, nos folículos antrais de oócitos com maiores dimensões espera-se que os núcleos sejam maiores.

Ao passo em que o volume dos oócitos aumenta antes do pico de LH, a zona pelúcida torna-se mais delgada. Esse achado pode ser compreendido por maior compressão na zona pelúcida causada pela pressão superior devido acúmulo de fluido no folículo, como sugere Calado et al. (2003b). É possível também que as diferenças observadas na espessura da zona pelúcida em relação aos diferentes tamanhos de folículos e fases do ciclo estral e gestação estejam de alguma forma relacionada com a expressão das proteínas ZPs (ZP1, ZP2 e ZP3) que ocorrem na zona pelúcida em animais domésticos (Sinowatz et al., 2001).

Em conformidade com os resultados anteriores encontrados em CCOs bovinos (Calado et al., 2001), foram observadas neste estudo três tipos de células do cumulus já descritas em bovinos pelos mesmo autores como sendo C1, C2 e C3. Divergindo dos achados observados por Calado et al. (2003b), houve diferença significativa no volume dos três tipos celulares nas fases de proestro e diestro. No entanto, no grupo das gestantes não houve diferença entre os tipos C2 e C3. Em todos os grupos estudados as células do tipo C3 tornaram-se largamente predominantes, com grande redução simultânea nos outros dois tipos de células. Em corroboração com os resultados encontrados por (Calado et al., 2001, 2003a, 2003b), os presentes dados apoiam a hipótese de que o tipo de células foliculares C3 derivam de células tipo C2 a partir do tipo C1. Essa diferenciação foi expressa nesse estudo não apenas por mudanças na frequência relativa de células foliculares dentro nos CCOs, mas pelo contínuo aumento no volume nuclear do tipo de células C1 para o tipo C3. Independentemente dos detalhes da dinâmica de diferenciação, o papel de cada uma daquelas células do CCO e a sua interação com o oócito, provavelmente provocam alterações na qualidade do oócito. Esta seria de acordo com estudo destacando a heterogeneidade funcional entre as células do cumulus de folículos em desenvolvimento em ratos (Rao et al., 1991; Kerketze et al., 1996), e a existência de onda folicular, em que os folículos de fases distintas ciclo estral provavelmente apresentam potencial de desenvolvimento diferentes (Singh e Adams, 2000). Em relação a possível significado fisiológico dos diferentes tipos de células do cumulus, alguns aspectos podem ser especulados. Primeiro, é possível que a progesterona exerça influência nos oócitos, núcleo dos oócitos e células do cumulus. Pois, foi observado expressiva diferença entre as variáveis analisadas nas fases folicular e progesterônica. Segundo, como houve alterações nos volumes de oócitos, e núcleos dos oócitos, podemos sugerir que as diferenças nas frequências numéricas de células foliculares afetam a expansão do cumulus, e a maturação do oócito. No entanto, apenas estudos usando a maturação *in vitro* e fertilização de CCOs de diferentes fases do estro podem revelar se complexos ricos no tipo de célula C3 possui maior capacidade funcional. Alternativamente, as alterações das células foliculares de todo o ciclo estral podem refletir uma diferenciação endócrina, independentemente do ciclo de maturação dos oócitos.

Levando-se em consideração os aspectos apresentados, percebe-se que a morfologia das células do *cumulus*, da zona pelúcida, do citoplasma e do núcleo de complexo *cumulus oophorus* de folículos antrais ovinos apresenta-se morfologicamente distintas de acordo com as fases do ciclo estral e gestação. Além disso, na fase de proestro os oócitos possuem maior volume, a zona pelúcida mais delgada e apresenta maior frequência de células do *cumulus* mais volumosas, denominadas de células C3. No entanto, apenas estudos usando a maturação

in vitro e fertilização de CCOs de diferentes fases do estro podem revelar se complexos colhidos nessa fase possuem maior capacidade funcional.

REFERÊNCIAS

- Andueza D., Alabart J.L., Lahoz B., Lahoz F.X. & Folch J. 2014. Early pregnancy diagnosis in sheep using near-infrared spectroscopy on blood plasma. *Theriogenology*. 81: 509-513.
- Bagger P.V., Bang L. & Christiansen M.D. 1989. Classification of isolated ovarian follicles using the nucleator: estimation of antral volume. *Acta Stereol.* 8: 123-126.
- Baldassarre H, Furnus C.C, Matos D.G. & Pessi H. 1996. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*. 45: 707-717.
- Baldassarre H. & Karatzas C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies in goats. *Animal Reproduction Science*. 82: 255-266.
- Baldassarre H. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*. 57: 275-284.
- Bernardi M. L. 2005. Produção in vitro de embriões ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33: 1-16.
- Calado A.M., Rocha E., Colaço A., Sousa M. 2001. Stereological characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the diestrous phase. *Biol. Reprod.* 65: 1383-1391.
- Calado A.M., Rocha E. Colaço A., Sousa M. 2003a. Stereological characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the metestrous and proestrous phases. *Theriogenology*. 60 :429-443.
- Calado A.M., Rocha E., Colaço A., Sousa M. 2003b. Stereological characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from mediantral follicles during the estrous cycle. *Tiss. Cell.* 35: 313-323.
- Calado A.M., Rocha E., Colaço A., Sousa M. 2005. Estudo estereológico comparativo de complexos cumulus-oócito aspirados de folículos durante o ciclo estral em bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57: 465-475.
- Caixeta E.S. & Dode M.A.N. 2008. Dissecção folicular: um método eficiente para estudos de competência ovocitária. Documentos 260, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.
- Cloete J.H.L. 1939. Prenatal growth in the Merino sheep. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 13: 417-557.
- Cognie Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod, P. 2004. State of the production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev.* 16: 437-445.
- De Loos F., Kastrop P. & Van Maurik P. 1991. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 255-259.
- Eloy A. M. X., Souza P. H. F. & Simplicio, A. A. 2011. Atividade ovariana pós-parto em ovelhas Santa Inês sob diferentes manejos de amamentação na região semiárida do Nordeste. *Revista Brasileira de Saúde e Produção*. 12: 970-983.

- Earl C.R., Irvine B.J., Kelly J.M., Rowe J.P. & Armstrong D.T. 1995. Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology*, 43: 203-208.
- Galli C. & Lazzari G. In vitro embryo production from valuable cows slaughtered for reproductive failure or terminal illness. p. 87-89. In: Scientific Meeting of the European Embryo Transfer, Proceedings. Lyon, 1997.
- Gundersen H.J.B. & Jensen E.B. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.*, 147: 229-263.
- Hyttel P. Callesen H. & Greve T. 1986. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil.* 76: 645-656.
- IBGE- 2010. Censo Agropecuário. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab17.pdf> Acesso em: 2014.
- Kerkette K., Blaschuk O.W. & Farookhi R., 1996. Cellular heterogeneity in the membrana granulosa of developing rat follicles: assessment by flow cytometry and lectin binding. *Endocrinology* 137: 3089-3100.
- Kühholzer B, Müller S, Treuer A, Seregi J, Besenfelder U, Brem G. 1997. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. *Theriogenology*. 48: 545-550.
- Leibfried L. & First N.L., 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48: 76-86.
- Prado O.R., Bastos G.M., Monteiro A.L.G., Saab B.B., Gilaverte S., Pierobom C.C., Hentz F., Martins L.H.S., Silva C.J.A., Dranca G.S., Stivari T.S.S. & Cerqueira G. 2013. Adição de plasma seminal ao sêmen descongelado e taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo fixo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65: 13-18.
- Ptak G. Dattena M. Loi P. Tischner M. & Cappai P. 1999. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*. 52: 1105-1114.
- Rao I.M., Allsbrook Jr., W.C., Conway B.A. Martinez J.E., Beck J.R., Pantazis C.G., Mills T.M., Anderson E. & Mahesh V.B., 1991. Flow cytometric analysis of granulosa cells from developing rat follicles. *J. Reprod. Fertil.* 91: 521-530.
- Rodríguez C., Anel L., Alvarez M., Anel E., Boixo J. C., Chamorro C.A. & Paz P. 2006. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reprod Domest Anim.* 41: 106-113.
- Sevillano C., Anel L., De La Fuente J., Alvarez M., Celorrio I. & De Paz P. 1997. In vitro development of sheep embryos derived of repeated laparoscopic folliculoaspiration. *Theriogenology*. 47: 298-303.
- Singh J. & Adams G.P. 2000. Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. *Anat. Rec.* 258: 58-70.
- Sinowatz F., Topfer-Petersen E., Kolle S. & Palma G. 2001. Functional morphology of the zona pellucida. *Anat. Histol. Embryol.* 30: 257-263.
- Simplício A.A.; Freitas V.J.F. & Fonseca J.F. 2007. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31: 234-246.
- Traldi A.S. 2009. Produção *in vitro* de embriões de ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38: 301-306.
- Varago F.C., Mendonca L.F., Moustacas V.S., Cruz B.C., Carvalho B.C. & Lagares M.A. 2009. Biotécnicas da reprodução aplicadas a pequenos ruminantes. *Ciência Animal Brasileira*. 10: 1-17.

TABELAS

Tabela 1

Quantidade de animais, número de células do cumulus e diâmetro de folículos nas fases de proestro, diestro, 30 e 60 dias de gestação.

	Proestro	Diestro	G30	G60	P
Nº de animais	4	4	10	10	
Nº de células do cumulus	44	47	53	57	
Diâmetro de folículos	5,1	4,7	4,3	4	

Tabela 2

Volume médio de oócito com e sem zona pelúcida, núcleo do oócito e espessura média da zona pelúcida de folículos antrais colhidos de ovelhas nas fases de proestro, diestro e aos 30 e 60 dias de gestação.

Estrutura	Proestro	Diestro	G30	G60	P
Oócito + ZP (μm^3)	36.0 x 10 ⁶ a	33.9 x 10 ⁶ b	31.8 x 10 ⁶ c	29.6 x 10 ⁶ d	<0,0001
Oócito (μm^3)	27.9 x 10 ⁶ a	25.8 x 10 ⁶ b	22.7 x 10 ⁶ c	20.7 x 10 ⁶ d	<0,0001
Núcleo do oócito(μm^3)	42.6 x 10 ³ a	50.6 x 10 ³ b	51.0x 10 ³ b	53.4 x 10 ³ c	<0,0001
Zona pelúcida (μm)	6.0a	7.1b	8.0c	8.0c	<0,003

Tabela 3

Volume médio dos tipos de células C1, C2, C3; seus respectivos núcleos e percentual relativo dos tipos de células, colhidos de folículos antrais de ovelhas nas fases de proestro, diestro, e aos 30 e 60 dias de gestação

	Proestro	Diestro	G30	G60	P
Células C1					
Célula	639.0a	562.2a	668.7a	650.4a	
Núcleo	153.2a	112.7a	110.3a	132.2a	
% de células	4.4a	5.1a	19.0a	26.7a	
Células C2					
Célula	1429.3b	1010.7b	1176.0b	1004.7b	
Núcleo	322.0b	398.3b	302.9b	276.3a	
% de células	5.1a	22.5b	33.8b	48.1b	
Células C3					
Célula	2293.9c	1891.8c	1793.6b	1582.3c	
Núcleo	921.5c	743.1c	596.2b	512.9b	
% de células	90,5b	72,4c	47,2c	21,4c	

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados nesse trabalho são pioneiros na espécie ovina e podem ser úteis para o desenvolvimento de métodos mais eficazes para a seleção de oócitos de maior competência. E consequentemente, maximizar o potencial das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões. No entanto, apenas estudos usando a maturação *in vitro* e fertilização de CCOs de diferentes fases do estro podem revelar se complexos ricos no tipo de célula C3 possuem maior capacidade funcional.

7. ANEXOS

**Instruções aos autores da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira
(PVB)**

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br)

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, **será incluída na lista uma só vez.** A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.