



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DE OVÓCITOS OVINOS DURANTE  
A MATURAÇÃO *IN VITRO***

**DÉBORAH MENDES MÁXIMO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO DE 2009**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DE OVÓCITOS OVINOS DURANTE  
A MATURAÇÃO *IN VITRO***

**Aluno: Déborah Mendes Máximo**

**Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves**

**Co-Orientador: Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO:09/2009**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO/2009**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DE OVÓCITOS OVINOS DURANTE  
A MATURAÇÃO *IN VITRO***

**Déborah Mendes Máximo**

**Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Animais.**

**APROVADA POR:**

---

**PROF. DR. JAIRO PEREIRA NEVES (Universidade de Brasília)**  
**CPF: 065.863.509-30**  
**E-mail: jpneves@unb.br**

---

**PROFA. DRA. SÔNIA NAIR BÁO (Universidade de Brasília)**  
**CPF: 331.813.490-20**  
**E-mail: snbao@unb.br**

---

**PROF. DR. HÉLIO BLUME (Faculdades Integradas - UPIS)**  
**CPF: 190.272.300-72**  
**E-mail: helio@upis.br**

**BRASÍLIA/DF 09 DE MARÇO DE 2009**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

**MÁXIMO, D. M. Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação *in vitro*.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 51 p. 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 e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

MÁXIMO, Déborah Mendes. **Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação *in vitro*.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. Microscopia eletrônica de transmissão 2. Mitocôndria hooded 3. Produção *in vitro* de embriões 4. Ovelhas

I. Neves, J. P. II. PhD

## AGRADECIMENTOS

A Deus, “porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são todas as coisas”. Agradeço pelo dom da vida e pela salvação. Obrigada Papai porque tens me dado sempre muito mais do que peço ou penso!

Ao Rodrigo, que no início desse projeto se tornou definitivamente minha família, por me apoiar em todos os momentos. Obrigada pelas incontáveis palavras de motivação, sem isso não teria continuado.

Ao papai e a mamãe por sempre acreditarem e investirem muito em mim. Sou grata por tudo. Vocês são um grande exemplo, obrigada por me ensinarem o que é realmente importante e em que vale a pena investir nessa vida.

A minha irmã, Roberta, pelas dicas e paciência nos desabafos durante toda essa jornada e ao meu cunhado pela “mãozinha” prestada na conclusão desse trabalho.

Ao professor Jairo, por me orientar a algum tempo com muita dedicação e aceitar esse novo desafio. Obrigada pelas oportunidades e por todo o apoio prestado durante esses últimos anos.

Ao professor Rafael Mondadori, por ter abraçado a proposta inicial do trabalho e por ter colocado à minha disposição o que era necessário para desenvolvê-lo na UPIS. Muito obrigado pela confiança. Agradeço também a toda equipe da UPIS, que de alguma forma se envolveu com este trabalho, pela receptividade e disposição para me ajudar.

A professora Carol, pela atenção e tempo dispensados no aperfeiçoamento deste trabalho. Aproveito para me desculpar pelo trabalho que dei nos “minutos finais”!

A professora Sônia, por disponibilizar o laboratório da MET e, especialmente, a aluna Ingrid que me acompanhou “religiosamente” durante alguns meses.

A amiga e colega de mestrado, Pri, pelo companheirismo.

A Emily, por ter superado o trauma e me ensinado as etapas de processamento do material para microscopia eletrônica.

Aos proprietários e funcionários dos abatedouros, por disponibilizarem os ovários utilizados nesse trabalho.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A ovinocultura no Brasil.....	2
2.2 Aspectos reprodutivos da fêmea.....	3
2.2.1 População e desenvolvimento folicular inicial.....	3
2.2.2 Dinâmica folicular.....	4
2.3 Biotecnologias aplicadas à reprodução.....	6
2.3.1 A produção <i>in vitro</i> de embriões ovinos.....	7
2.4 Maturação ovocitária <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> .....	8
2.4.1 Maturação nuclear.....	8
2.4.2 Maturação citoplasmática.....	9
2.4.2.1 Redistribuição de organelas citoplasmáticas.....	10
2.4.3 Modificações ultraestruturais do ovócito durante a foliculogênese.....	14
3. JUSTIFICATIVA.....	15
4. OBJETIVO GERAL.....	15
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO 2 .....	21
Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação <i>in vitro</i>	
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 Coleta e manipulação dos ovários.....	25
2.2 Aspiração folicular e recuperação dos ovócitos.....	25

2.3 Maturação <i>in vitro</i> .....	25
2.4 Processamento dos CCOs para microscopia eletrônica.....	26
2.5 Análise.....	26
3. RESULTADOS.....	27
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1.1: Representação esquemática de uma onda folicular em ovelhas durante o ciclo estral. Três ondas foliculares são mostradas na figura. \* indica o surgimento do FSH na fase pré-ovulatória coincidindo com o pico de LH. A figura também mostra os picos periódicos do FSH que precedem cada emergência de ondas foliculares.....05

Figura 1.2: Distribuição das organelas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto em bovinos. A) progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de VG até MII e formação do zigoto. B) Distribuição de organelas e mecanismo de liberação dos GC ( $\text{Ca}^{2+}$ ) após a entrada do espermatozóide no ovócito durante a fertilização.....13

### CAPÍTULO 2

Figura 2.1: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos imaturos, tempo 0 hora. A) Imagem do aspecto geral do citoplasma e da disposição compactada das células do cumulus. B) Imagem do citoplasma do ovócito onde se observa a concentração de pequenos grupos de mitocôndrias na periferia do citoplasma (setas) e sua associação com gotas lipídicas. C) Imagem do citoplasma do ovócito onde o núcleo possui localização periférica e vesículas de tamanhos variados se encontram dispersas pelo citoplasma. Observar o espaço perivitelinico reduzido e com pequenas microvilosidades. CC – células do cumulus; ZP – zona pelúcida; EP – espaço perivitelinico; GL – gota lipídica; V – vesícula; N – núcleo.....28

Figura 2.2: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 6 horas de MIV. A) Imagem das células do cumulus as quais apresentam um maior espaçamento entre si. B) Citoplasma do ovócito contendo grupos maiores de *hooded* mitocôndrias (setas) dispostas na periferia. Observar o aumento do espaço perivitelinico e das microvilosidades que se projetam para a zona pelúcida. C) Imagem do citoplasma do ovócito evidenciando grupos periféricos de mitocôndrias (setas), geralmente associadas a gotas lipídicas. CC – células do cumulus; ZP – zona pelúcida; EP – espaço perivitelinico; GL – gota lipídica; V – vesícula...29

Figura 2.3: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 12 horas de MIV. A) Imagem do citoplasma do ovócito no qual se observa o início do processo de disposição das mitocôndrias (setas) organizadas em “teias”. B) Imagem do citoplasma do ovócito mostrando a disposição de gotas lipídicas na periferia e o alinhamento dos grânulos da cortical junto à membrana plasmática (cabeça de seta). GL – gota lipídica; ZP – zona pelúcida.....30

Figura 2.4: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 18 horas de MIV. A) Imagem das células do cumulus e zona pelúcida do ovócito. Observar o maior espaçamento entre as células do cumulus. B) Imagem do citoplasma do ovócito onde as setas indicam as mitocôndrias dispostas ao redor de pequenas regiões menos eletrondensas do citoplasma. Observar também a diminuição de vesículas e a retomada da posição mais interna das gotas lipídicas. As cabeças de seta mostram grânulos da cortical em íntimo contato com a membrana plasmática. CC – células do cumulus; ZP – zona pelúcida; GL – gota lipídica.....31

Figura 2.5: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 24 horas de MIV. A) Imagem das células do cumulus evidenciando o alongamento destas células e o espaço entre elas preenchido por material de secreção, sugestivo de ácido hialurônico. B) Imagem do citoplasma do ovócito onde há gotas lipídicas (GL) concentradas na periferia do citoplasma. As setas indicam mitocôndrias sem qualquer padrão de distribuição. Observar também os pontos de retração citoplasmática (seta larga) CC – células do cumulus; AH – provável ácido hialurônico; ZP – zona pelúcida.....32

## RESUMO

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DE OVÓCITOS OVINOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO*.** Déborah Mendes Máximo. Orientador: Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

O objetivo deste trabalho foi descrever e avaliar, através da análise de aspectos ultraestruturais, o processo de maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos ovinos por um período de 24 horas após a inserção de ovócitos imaturos no meio de maturação. Para isso, foram coletados ovários de abatedouro, sendo os folículos aspirados no laboratório. Os complexos *cumulus oophorus* (CCO) selecionados foram divididos em grupos e transferidos para o meio de maturação onde permaneceram por 6, 12, 18 e 24 horas após o início do processo, exceto o tratamento 0 hora. Após a retirada das estruturas nos diferentes tempos de maturação, essas foram processadas para a microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado no tratamento 0 hora que os ovócitos possuíam características compatíveis com estruturas imaturas e após 6 horas de MIV ocorria a migração de mitocôndrias e lipídeos para a periferia citoplasmática e início de expansão das células do cumulus. Tais alterações relacionam-se ao processo de aumento de atividade metabólica ovocitária e início do processo de maturação que levará o ovócito até o estágio de metáfase II. Entre 12 e 18 horas de MIV foram observados rearranjos citoplasmáticos de organelas, tais como o alinhamento e aumento dos grânulos da cortical associados à membrana plasmática, que permitiram inferir sobre o processo de maturação nuclear, sugerindo que, nessa espécie, 18 horas de MIV seriam suficientes para o ovócito atingir sua maturação citoplasmática e nuclear e ser fertilizado. Foi observado também a presença de mitocôndrias do tipo *hooded* em alguns momentos da maturação. Tais estruturas são comumente encontradas em ovócitos de outras espécies e podem estar relacionadas há um aumento da atividade metabólica mitocondrial durante o período de migração de organelas. Após 24 horas de MIV, os ovócitos avaliados apresentavam características de degeneração o que pode estar ligado ao envelhecimento desta célula devido à sua permanência por mais 6 horas no meio MIV depois da aquisição de competência para a fertilização *in vitro* (FIV). Este trabalho permitiu a avaliação de aspectos ultraestruturais da MIV em ovinos, bem como forneceu conhecimentos a respeito da maturação nuclear. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para aprimorar essa importante biotécnica nessa espécie.

Palavras chave: microscopia eletrônica de transmissão, mitocôndrias *hooded*, produção *in vitro* de embriões.

## ABSTRACT

**ULTRASTRUCTURE CHARACTERISTICS OF SHEEP OOCYTES DURING *IN VITRO* MATURATION.** Déborah Mendes Máximo. Orientador: Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

The aim of this study was describe and evaluate, by analysis of ultrastructural aspects, the *in vitro* maturation (IVM) process of the sheep oocytes during 24 hours after insertion of immature oocytes in maturation medium. For this, ovaries were collected from slaughterhouse and its follicles were aspirated on laboratory. The selected cumulus oocyte complex (COC) were divided into groups and transferred to the maturation medium where they were maintained for 6, 12, 18 and 24 hours after the beginning of process, except the 0 hour treatment. The structures were removed after different maturation times and processed to transmission electron microscopy. In 0 hour treatment the oocytes had compatible characteristics with immature structures and, after 6 hours of IVM, there was migration of mitochondrias and lipids to the cytoplasm periphery and the onset of cumulus cells expansion. These alterations were compatible with increasing metabolic activity on oocyte and the onset of maturation process that enable the structure to reach metaphase II. Between 12 and 18 hours of IVM, were observed cytoplasmic rearrangements of organelles, like aligning and increasing of cortical granules associated with plasmatic membrane, that were related to the process of nuclear maturation, suggesting that, in this specie, 18 hours of IVM were enough to the oocyte reach nuclear and cytoplasmic maturation and be fertilized. The presence of hooded mitochondrias in some times of maturation was observed. These structures were commonly found on other species oocytes and could be related to increase of mitochondrial activity metabolic during organelles migration. After 24 hours of IVM, the oocytes had characteristics of degeneration that can be related to cellular aging because of the persistence on the maturation medium after acquisition competence to *in vitro* fertilization (IVF). This work enabled the evaluation of the ultrastructural aspects of sheep IVM and provide knowledge about the nuclear maturation. However, more studies must be performed to refine this important biotechnique in sheeps.

Key words: transmission electron microscopy, hooded mitochondrias, *in vitro* embryo production.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

°C – Graus Celsius

ATP – Adenosina trifosfato

CCO – Complexo *cumulus oophorus*

CIV – Cultivo *in vitro*

CP – Corpúsculo polar

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio folículo estimulante

GC – Grânulos da cortical

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

LH – Hormônio luteinizante

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

IA – Inseminação artificial

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MIV – Maturação *in vitro*

PBS – Phosphate buffered saline

PIV – Produção *in vitro*

PIVE – Produção *in vitro* de embrião

RE – Retículo endoplasmático

RNAm – RNA mensageiro

RNAr – RNA ribossômico

TE – Transferência de embrião

VG – Vesícula germinativa

ZP – Zona pelúcida

μl – Microlitro

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem se consolidando no agronegócio brasileiro e dentro dessa perspectiva, evidencia-se a necessidade de conhecimento dos aspectos produtivos e reprodutivos desses animais para a multiplicação eficiente dos rebanhos. Para isto, tem-se à disposição biotécnicas reprodutivas como a sincronização de estros, a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE).

A PIVE de ovinos ainda mantém um caráter experimental acentuado, mas os estudos efetuados com essa espécie resultaram em contribuições significativas para esta técnica em outras espécies, principalmente no que diz respeito aos sistemas de cultivo *in vitro* (BERNARDI, 2005). Desta forma, esforços têm sido direcionados no aperfeiçoamento das diferentes técnicas e etapas envolvidas na produção de embriões ovinos *in vitro*. Porém, o sucesso da PIV está intimamente ligado à maturação *in vitro* (MIV), sendo este um dos fatores limitantes. Prova disso é que mesmo após seleção cuidadosa de uma população de complexo *cumulus oophorus* (CCO) homogênea, apenas 35% irão obter maturação citoplasmática completa e possuirão capacidade para produzir blastocistos viáveis e transferíveis (BLONDIN; SIRARD, 1995). Com isto, a maturação inadequada, seja citoplasmática ou nuclear, resulta em baixos índices de fecundação e bloqueio do desenvolvimento embrionário.

Sendo assim, considerando que todas as etapas do processo de produção de embriões *in vitro* são importantes – MIV, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) – sem dúvida, o conhecimento desta primeira etapa é ponto crucial para promoção de uma adequada maturação citoplasmática e nuclear, pois interfere, certamente, nas demais etapas, incrementando a proporção de ovócitos clivados e de embriões produzidos *in vitro*.

A microscopia eletrônica é uma das técnicas que permite a investigação da maturação citoplasmática e tem sido utilizada por diversos pesquisadores para elucidação de detalhes da morfologia de ovócitos bovinos imaturos (LOOS et al., 1989; VAN BLERKOM et al., 1990), maduros (FLEMMING; SAACKE, 1972; KRUIP et al., 1983; HYTTEL et al., 1986a; LOOS et al., 1992), superovulados (HYTTEL et al., 1986b; ASSEY et al., 1994b) e dominantes versus subordinados (ASSEY et al., 1994a). A espécie ovina ainda é carente em estudos dessa natureza, portanto, o objetivo desse trabalho foi elucidar aspectos ultraestruturais da maturação citoplasmática *in vitro* nessa espécie considerando as deficiências citadas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A ovinocultura no Brasil

Inicialmente a criação de ovinos no Brasil era voltada para a produção de lã, sendo os maiores rebanhos criados na Região Sul. Aos poucos, contudo, ajustando-se às necessidades do mercado nacional, os animais foram sendo adaptados para produção de lã e de carne. No início da década passada foi verificada uma tendência de queda nos preços da lã nos mercados internacionais, ocasionada pelo aumento da oferta e melhoria na qualidade das fibras sintéticas. Como consequência da inevitável crise mundial que atingiu as criações de ovinos lanados, programas de engenharia genética passaram a buscar novos padrões de animais que fossem especializados, também, na produção de carne.

Diante deste cenário, os ovinos deslanados surgiram como alternativa viável e permitiram o desenvolvimento da ovinocultura em regiões onde, até então, a criação destes animais não tinha expressão econômica. Dados do IBGE (2006) mostram que a ovinocultura está em expansão em praticamente todo o país, expandindo-se para regiões onde não havia tradição na exploração econômica de ovinos. Tais fatos apontam para um cenário em que a tendência desta atividade é aumentar a sua efetiva participação no produto interno bruto do agronegócio brasileiro.

Entretanto, as atividades dão-se de forma diferenciada nas regiões geográficas do Brasil. A região Nordeste possui tradição nestas atividades, cuja maior parte da produção é voltada para subsistência (VASCONCELOS; VIEIRA, 2002). No Sul do país existe a forte presença de ovinos lanados que são mais adaptados a baixas temperaturas, onde a criação é destinada à produção de lã e carne. Na região Sudeste, alguns rebanhos ovinos são direcionados com o objetivo de originar produtos com maior agregação de valor, destacando-se atualmente na produção de queijos e cortes especiais (NOGUEIRA et al., 2005). A região Centro-Oeste, tradicionalmente produtora de grãos e pecuária de leite e corte, surge hoje com uma ovinocultura que cresce de forma consistente (DIAS et al., 2004).

Considerando a grande importância econômica que a espécie ovina vem adquirindo nos últimos anos em diferentes regiões do Brasil, torna-se relevante o aprimoramento de técnicas que permitam a multiplicação eficiente desses animais, principalmente das fêmeas, visto que os machos já possuem tais técnicas com resultados mais consolidados.

## **2.2 Aspectos reprodutivos da fêmea**

Antes de iniciar as considerações a respeito das técnicas de reprodução assistida utilizadas na multiplicação da espécie ovina, é importante o conhecimento de algumas particularidades relacionadas à biologia dos gametas femininos e da fisiologia reprodutiva desses animais.

### **2.2.1 População e desenvolvimento folicular inicial**

A ovogênese compreende a formação, desenvolvimento e maturação dos gametas femininos. Esse processo tem início durante a vida embrionária com rápida multiplicação nos ovários de células germinativas primordiais e ovogônias por divisões mitóticas (FAIR, 2003). As ovogônias sofrem a primeira divisão meiótica originando os ovócitos, os quais são envolvidos por uma única camada de células epiteliais e são denominados de folículos ovarianos primordiais.

O folículo ovariano é a unidade estrutural e funcional do ovário o qual contém um ovócito cercado por células da granulosa, uma membrana basal e células da teca organizadas e associadas a tal membrana (WU et al., 2001). De acordo com o grau de evolução, os folículos ovarianos podem se dividir em: pré-antrais e antrais. Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular ovariana e são classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento em folículos primordiais, primários e secundários. Quando há o acúmulo de líquido folicular na cavidade antral o folículo é denominado terciário o qual, posteriormente, evolui para o folículo pré-ovulatório ou de Graaf (GEORGE et al., 1998).

Uma vez que os ovócitos alcançam a fase diplótena (prófase da primeira divisão meiótica), estes têm a meiose interrompida. A meiose pode ser reiniciada em duas situações: primeiro, na puberdade, em resposta ao pico de LH levando à ovulação, sendo esta ativação da meiose caracterizada pela dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina, processo denominado desarranjo da vesícula germinativa (RICHARD; SIRARD, 1996). Segundo, na retirada dos ovócitos imaturos do ambiente folicular levando a um reinício da meiose espontâneo (BEVERS et al., 1997).

Uma grande quantidade de folículos primordiais já está presente durante o desenvolvimento fetal das ovelhas, sendo esses primeiros folículos formados em torno dos 70 dias de gestação (MARIANA et al., 1991). Embora seja muito variável, é estimado que exista em torno de 40.000 a 3.000.000 de folículos nesta espécie ao nascimento (DRIANCOURT et

al., 1991) e, em ovelhas adultas, 50 folículos em fase antral já estariam presentes em qualquer momento do ciclo estral (DRIANCOURT et al., 1986). Parece haver uma relação entre o tamanho da reserva de folículos primordiais e a proporção de folículos que iniciam seu desenvolvimento; dessa forma, o número de folículos em fase antral observado durante o ciclo estral, pode refletir, pelo menos em parte, a reserva de folículos primordiais presentes (GÜLEKLI et al., 1999).

Variações significativas entre indivíduos e entre raças, e a população ovariana poderiam ser a chave para explicar diferenças nos resultados de TE/FIV obtidos em determinados grupamentos genéticos. Entretanto, em animais de produção esta relação pode ser diminuída por diferentes fatores que interferem no processo de recrutamento folicular, como balanço metabólico, condição corporal, condições ambientais, dentre outros (BONI et al., 1997).

O crescimento dos folículos do estágio primordial ao antral inicial é definido como desenvolvimento folicular inicial. Este período dura em torno de seis meses em ovelhas e não é dependente de hormônios gonadotróficos (CAHILL; MAULEON, 1980). Tisdall et al. (1995) sugeriram que em ovelhas receptores para FSH estão presentes nas células da granulosa de folículos primários, embora Fortune (2003) tenha demonstrado uma habilidade variável do FSH em estimular o desenvolvimento folicular pré-antral. Este autor sugere que as fases iniciais do desenvolvimento folicular são controladas por fatores intraovarianos, mas essas ainda não são bem elucidadas.

### **2.2.2 Dinâmica folicular**

Há duas fases relacionadas ao desenvolvimento folicular tanto em ovinos quanto bovinos. A primeira, fase pré-antral, é independente de gonadotrofinas. A segunda, fase antral, requer um suporte gonadotrófico e é caracterizada pelo desenvolvimento folicular em um padrão de ondas. O hipotálamo está envolvido na secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, juntamente com este, a glândula pituitária é responsável pela liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). Essas gonadotrofinas possuem uma grande influência na emergência e crescimento folicular.

A secreção de FSH durante o ciclo estral de ovelhas não é pulsátil, entretanto há uma variação diária nas concentrações desse hormônio, sendo observados picos de FSH a cada 5 dias o que coincide com a emergência de ondas foliculares (EVANS et al., 2000). Ondas foliculares caracterizam-se por um crescimento sincronizado de um grupo de folículos

(emergentes), seguido pelo crescimento de um ou mais (fóliculo dominante), enquanto o restante regride (fóliculos subordinados). O desenvolvimento e aplicação da ultra-sonografia transretal e da laparoscopia levou a um maior entendimento das ondas foliculares em ovelhas (Figura 1). O padrão de emergência e crescimento folicular em ondas nessa espécie ocorre a cada 4 a 5 dias e, como citado anteriormente, cada onda é precedida por um aumento nas concentrações de FSH (EVANS et al., 2000).

De acordo com Ginther et al. (1995), cada onda folicular contém 1 a 4 folículos crescendo de 2 - 3 mm de diâmetro a 4 - 12 mm antes da regressão ou ovulação e o número de ondas foliculares por ciclo pode variar entre raças, mas gira em torno de 2 a 4 ondas. Entretanto, a seleção, recrutamento e dominância ainda não estão completamente elucidados nos ovinos.

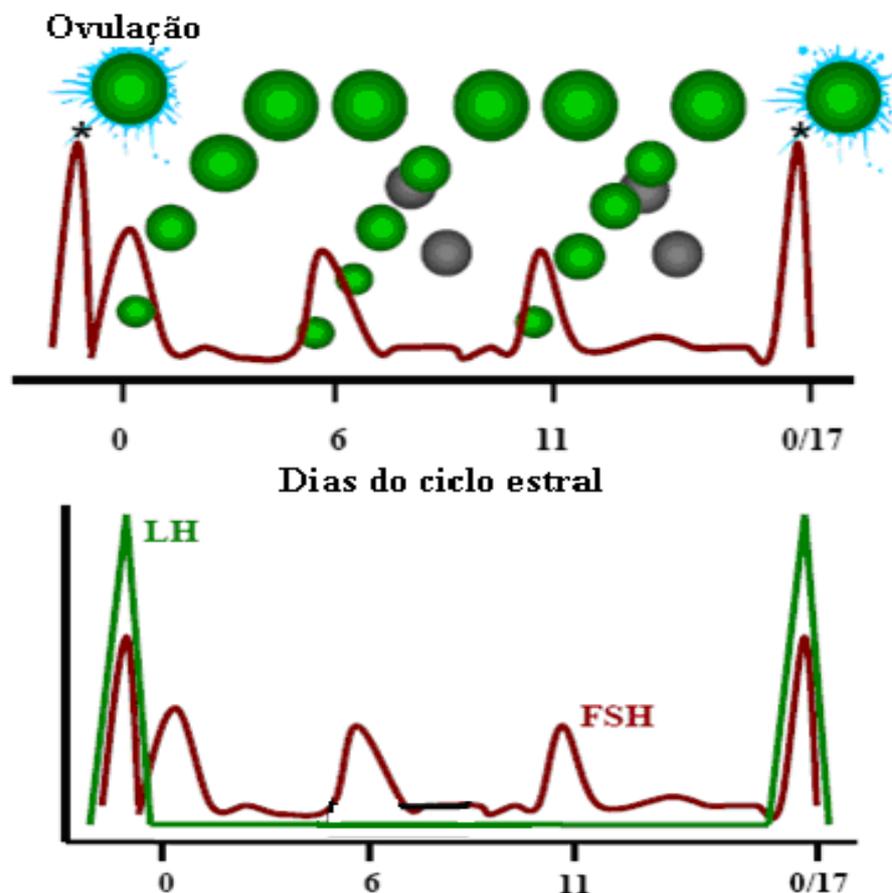


Figura 1.1: Representação esquemática de uma onda folicular em ovelhas durante o ciclo estral. Três ondas foliculares são mostradas na figura. \* indica o surgimento do FSH na fase pré-ovulatória coincidindo com o pico de LH. A figura também mostra os picos periódicos do FSH que precedem cada emergência de ondas foliculares.

Fonte: Duggavathi, 2004.

Uma vez que o folículo atinge a dominância, este inibe o desenvolvimento de outros folículos devido à sua capacidade de sintetizar estradiol e progesterona e adquire receptores de FSH e LH nas células da granulosa. Em ovelhas, há evidências de que o folículo ovulatório exerce esse efeito de dominância sobre o restante dos folículos em desenvolvimento durante a fase folicular, levando-os à atresia (EVANS et al., 2000). Entretanto, em algumas raças mais prolíficas (Booroola), em torno de 50% dos folículos da penúltima onda folicular ovulam juntamente com os folículos ovulatórios da onda final do ciclo (BARTLEWSKI et al., 1999).

Nas ovelhas, há dois padrões de secreção do LH, sendo que cada um controla diferentes aspectos da função ovariana. O LH pré-ovulatório surge 14 horas antes da ovulação, sendo responsável por induzir este evento e formar o corpo lúteo. Este pico surge no momento em que a progesterona tem seus níveis diminuídos e há o aumento da secreção de estradiol durante a fase final do ciclo estral. A secreção pulsátil de LH ocorre no decorrer do ciclo e é importante na promoção da esteroidogênese ovariana (GOODMAN, 1994). A liberação de LH no estágio pré-ovulatório é acompanhado por um pico de FSH com duração de 11 a 12 horas.

### **2.3 Biotecnologias aplicadas à reprodução**

A reprodução assistida de ovinos constitui-se de uma ferramenta para o incremento do número de animais de um rebanho através da redução no intervalo entre gerações associada à multiplicação de material genético superior. A exploração dessa espécie ainda é carente em tecnologias avançadas, apesar disso, tem havido uma demanda por biotécnicas como a sincronização de estros, IA, TE e a PIVE.

A IA permite aumentar significativamente a produtividade da progênie quando se utilizam reprodutores devidamente selecionados a partir de testes de progênie (EVANS; MAXWELL, 1987). Tal biotécnica possui resultados mais consolidados e, como visto, está intimamente associada à multiplicação dos animais a partir do material genético do macho. A TE também propicia a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores, além de permitir a redução do intervalo entre gerações por possibilitar a colheita de embriões de fêmeas jovens e pré-púberes. Entretanto, essa biotécnica possui inconvenientes tais como, a variação na resposta do tratamento superovulatório e as seqüelas deixadas no trato reprodutivo devido à intensa manipulação quando da colheita dos embriões.

A PIVE em pequenos ruminantes tem despertado um grande interesse científico em virtude da disponibilidade de material para pesquisa a um baixo custo além de estas espécies

serem um excelente modelo para aplicação da transgênese. Esta técnica ainda mantém um caráter experimental acentuado e necessita de estudos que elucidem as etapas envolvidas em todo o processo.

Os resultados inconsistentes da PIVE em ovinos ainda são entraves na utilização comercial desta biotécnica. O que ocorre, muitas vezes, é a falta de informações específicas sobre essa espécie levando à adaptação de técnicas já difundidas em bovinos impossibilitando a obtenção de melhores resultados. A espécie ovina possui suas particularidades e essas devem ser estudadas e aplicadas na biotécnica de PIVE, pois além de ser fonte de embriões para pesquisas básicas de biologia e fisiologia do desenvolvimento, a técnica possui bom potencial para aplicação no melhoramento genético de rebanhos, bem como na produção de clones e animais transgênicos (BERNARDI, 2005).

### **2.3.1 A produção *in vitro* de embriões ovinos**

A PIV caracteriza-se pela manipulação dos gametas em nível laboratorial e envolve as etapas de MIV dos ovócitos aspirados dos ovários; capacitação espermática e FIV dos ovócitos maturados e o CIV dos embriões até o estágio de blastocisto. Em comparação com a tradicional TE após ovulação múltipla, a coleta repetida de ovócitos seguida pela maturação, fertilização e pelo cultivo *in vitro* apresenta um maior potencial de produção de embriões de uma única doadora (BALDASSARRE et al., 1994; KÜHHOLZER et al., 1997; SEVILLANO et al., 1997). Outras vantagens associadas a essa técnica incluem a possibilidade do uso de animais pré-púberes, púberes, gestantes e lactantes como doadores (EARL et al., 1995; ANEL et al., 1997); produção de embriões de fêmeas valiosas que morreram ou que serão destinadas ao abate (GALLI; LAZZARI, 1993) e desenvolvimento de pesquisas na área de transferência nuclear e transgênese (BALDASSARRE et al., 2002).

A técnica de PIV de embriões vem sendo amplamente desenvolvida ao longo dos últimos anos. Desde o nascimento do primeiro bezerro proveniente da FIV de ovócitos provenientes de doadoras tratadas hormonalmente (BRACKETT et al., 1982), esforços têm sido feitos no intuito de estender o uso da técnica nas demais espécies animais. Nos meados da década de 80 foram obtidos os primeiros cordeiros oriundos da FIV de ovócitos ovinos maturados *in vivo* (CHENG et al., 1986). Alguns anos mais tarde, foi relatado o nascimento do primeiro cordeiro oriundo da realização de todas as etapas *in vitro* (CZLONKOWSKA et al., 1991).

Componentes do CCO têm sido objeto de muitas investigações ao longo dos anos com o objetivo de aumentar a competência ovocitária na FIV. Em bovinos, embora os índices da MIV e FIV sejam altos (80%), apenas em torno de 30% desses ovócitos se desenvolvem até o estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2002). Portanto, um dos pontos cruciais da produção de embriões tanto *in vivo* como *in vitro* é o processo de maturação ovocitária, pois é nessa etapa que o ovócito adquire competência, ou seja, ele se torna capaz de completar a maturação, ser fertilizado e suportar o desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL et al., 1997).

#### **2.4 Maturação ovocitária *in vivo* x *in vitro***

A maturação do ovócito é definida como o evento que permite que ele seja fecundado e se torne capaz de iniciar o programa de desenvolvimento da pré-implantação embrionária (LEIBFRIED-RUTLDGE et al., 1987). Tal processo compreende duas etapas principais; primeiro a maturação nuclear que envolve a condensação do material nuclear para formar os cromossomos, seguida por dois ciclos meióticos; e segundo, a maturação citoplasmática, que compreende a redistribuição de organelas (THIBAUT et al., 1987; SZÖLLÖSI, 1993).

Na produção de embriões *in vivo*, aproximadamente 81% dos ovócitos ovulados se desenvolvem em embrião (PETERS, 1996); enquanto na PIV, como discutido anteriormente, apenas 30%, em média, desses ovócitos se desenvolvem até o estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2002). Tais diferenças também são influenciadas pelas diferenças de competência de desenvolvimento entre os ovócitos, além das circunstâncias da PIVE. Além disso, na PIVE trabalha-se com uma população heterogênea de ovócitos, pois estes encontram-se em estágios diversos de desenvolvimento, o que leva à obtenção de diferenças importantes nos resultados da biotécnica (HENDRIKSEN et al., 2000).

Portanto, a qualidade intrínseca dos ovócitos é o fator determinante da proporção de ovócitos que atingirão o estágio de blastocisto sendo que, ovócitos maturados *in vivo* são mais competentes do que aqueles maturados *in vitro* (RIZOS et al., 2002).

##### **2.4.1 Maturação nuclear**

O objetivo da maturação nuclear é a obtenção de um gameta haplóide através de dois ciclos de divisão celular meiótica. A competência meiótica inicia-se durante a formação do antro porém, mesmo competente, o ovócito permanece na prófase I até o pico de LH. Os ovócitos ficam bloqueados no estágio de dictióteno da prófase I, conhecido como vesícula

germinativa (VG), até completarem seu desenvolvimento (MEHLMANN, 2005). A retomada da meiose, como citado anteriormente, é induzida *in vivo* pelo pico de LH ou quando os ovócitos são isolados do ambiente folicular e colocados em meios de maturação *in vitro*. (BEVERS et al., 1997).

Após o pico, o LH irá atuar via receptores localizados em células da granulosa (EPPIG et al., 1997), implicando assim em um mecanismo de estimulação indireta na maturação do oócito. O reinício da meiose é caracterizado pela quebra da VG seguido de uma condensação de cromossomos e formação do fuso da metáfase I (MI). Esta primeira divisão meiótica se completa com a segregação de cromossomos homólogos entre o ovócito e o primeiro corpúsculo polar, levando o ovócito a metáfase II (MII) onde permanece até a fecundação (DEKEL, 2005).

Nos ovócitos bovinos as células da granulosa inibem o reinício da meiose (BEVERS et al., 1997) e quando o meio é suplementado com fluido folicular aumenta-se a inibição (SIRARD; BILODEAU, 1990). Richard e Sirard (1996) demonstraram que as células foliculares estão envolvidas no mecanismo de supressão da meiose, em particular as células da teca. Os eventos nucleares e citoplasmáticos que ocorrem durante este processo são chamados de maturação ovocitária e são pré-requisitos para a formação de um ovócito competente (ASSEY et al., 1994a).

#### **2.4.2 Maturação citoplasmática**

Os complexos eventos que ocorrem durante a maturação ovocitária não dependem apenas da separação cromossômica durante a maturação nuclear, mas também da redistribuição de organelas citoplasmáticas e do armazenamento de RNAm, proteínas e fatores de transcrição necessários para este processo. A transcrição e o armazenamento de proteínas no citoplasma do ovócito são de fundamental importância no processo de maturação e garantem o progresso do desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de oito células em bovinos, quando o genoma embrionário é ativado e a síntese de novas proteínas torna-se necessária (MEIRELLES et al., 2004).

O processo de maturação citoplasmática pode ser dividido em três principais eventos: a redistribuição de organelas citoplasmáticas, a movimentação de filamentos do citoesqueleto e a maturação molecular. A presente revisão abordará somente a etapa de redistribuição de organelas por esta ser o foco da avaliação ultraestrutural no trabalho a seguir.

### 2.4.2.1 Redistribuição de organelas citoplasmáticas

Sabe-se que várias modificações ultraestruturais relativas à morfologia e redistribuição podem ser observadas em organelas citoplasmáticas durante a maturação ovocitária. O tráfego de organelas durante a maturação ocorre através da atuação de microfilamentos e microtubulos do citoesqueleto e o reposicionamento das organelas depende das necessidades da célula durante cada estágio de desenvolvimento (FERREIRA et al., 2008).

#### *Mitocôndrias*

A ativação metabólica envolvida com a síntese de proteínas e a fosforilação são indispensáveis à maturação citoplasmática. Neste contexto, as mitocôndrias exercem um papel de extrema importância, pois são componentes chave na maquinaria metabólica responsável pelo suprimento de energia que é consumida durante o processo de maturação. O movimento das mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia é crucial para os ovócitos e blastocistos durante períodos críticos do ciclo celular. Estudos mostram que durante o período de maturação, as mitocôndrias sintetizam o ATP necessário para a síntese de proteínas que, posteriormente, suportam o completo processo de maturação e desenvolvimento embrionário (STOJKOVIC et al., 2001).

Análises ultraestruturais de ovócitos bovinos maturados *in vivo* mostram que as mitocôndrias apresentam distribuição periférica antes do surgimento do LH, se agrupam no estágio final da maturação nuclear, e se dispersam novamente após a extrusão do corpúsculo polar, aproximadamente 19 horas após o aparecimento do LH (Figura 1.2A). Ao atingir a MII, as mitocôndrias juntamente com as gotas lipídicas, ocupam uma posição central na célula (HYTTEL et al., 1997).

Recentes estudos mostram que o número de mitocôndrias presentes no citoplasma de ovócitos bovinos varia de acordo com o estágio de desenvolvimento celular. Ovogônias apresentam 200 unidades dessa organela enquanto os ovócitos primários possuem aproximadamente 6.000. Esse número aumenta ainda mais durante a maturação ovocitária. Portanto, o metabolismo ovocitário depende tanto da presença quanto da quantidade de mitocôndrias, visto que um número reduzido destas pode causar distribuição anormal de organelas durante a embriogênese inicial (SHOUBRIDGE et al., 2007).

## *Ribossomos e Retículo Endoplasmático*

A síntese protéica é importante não somente para a maturação citoplasmática, mas também para a formação do zigoto e desenvolvimento embrionário inicial. Para este fim, uma quantidade apropriada de ribossomos deve estar presente durante a maturação. Ribossomos são sintetizados pela transcrição de genes de RNA ribossômico (RNAr), pelo processo de transcrição e adição de proteínas ribossomais às suas subunidades. O nucléolo é o sítio de formação das subunidades ribossomais e durante as fases de crescimento do ovócito e ativação do genoma embrionário ele está presente na forma fibrinogranular, refletindo a alta atividade de síntese ribossomal. O ovócito de folículos primordiais possui atividade transcricional quiescente e o nucléolo é exclusivamente composto da porção granular, sinalizando a ausência da atividade de síntese ribossomal (FAIR et al., 2001).

Durante a MI, a síntese protéica do ovócito é, aproximadamente, três vezes maior do que durante a fase de quebra da VG. Quando a célula atinge a MII, entretanto, o ovócito apresenta níveis basais de tradução do RNAm. Portanto, os altos níveis de síntese protéica observados na MI, ao contrário do encontrado em MII, pode ser devido ao grande armazenamento ribossomal durante a MI. Como consequência da ampla utilização dessas organelas durante o processo de maturação até a MII, o armazenamento de proteínas é reduzido e, então, a quantidade de ribossomos e os níveis de síntese protéica podem ser comparativamente menores. Nesse caso, esta evidência suporta a idéia de que a presença de ribossomos é diretamente ligada à síntese protéica durante períodos cruciais de desenvolvimento (TOMEK et al., 2002).

As membranas do retículo endoplasmático (RE) são fisiologicamente ativas, interagem com o citoesqueleto e contêm diferentes domínios especializados em funções diversas. Incluem-se entre as funções do RE a formação e degradação protéica, o metabolismo lipídico, a compartimentalização do núcleo, regulação do gradiente iônico de cálcio e síntese de membranas (LIPPINCOTT-SCHWARTZ et al., 2000). Mudanças bioquímicas e estruturais no RE durante a maturação são críticas para um funcionamento apropriado da regulação intracelular de cálcio. Em ovócitos de mamíferos o RE é encontrado em regiões corticais e se acumula em pequenos aglomerados no citoplasma durante seu desenvolvimento até MII e a liberação de cálcio é aumentada depois da maturação (Figura 1.2A). Durante a fertilização, a entrada do espermatozóide no ovócito é acompanhada pela liberação de cálcio pelo RE seguida pelo início do desenvolvimento embrionário (STRICKER, 2006).

### *Grânulos da Cortical*

Os grânulos da cortical (GC) são derivados do complexo de golgi e a sua exocitose é um dos mecanismos usados pelos ovócitos para prevenir a polispermia (Figura 1.2B). São organelas encontradas exclusivamente em ovócitos sendo compostas por proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanas. Para ovócitos no estágio de VG, os grânulos estão distribuídos em grupos no citoplasma. No final do período de maturação, quando esses ovócitos atingem o estágio de MII, os GC se posicionam em contato íntimo com a membrana plasmática, como forma estratégica de aguardar a entrada do espermatozóide e a ativação ovocitária para promover o bloqueio da poliespermia (THIBAULT et al., 1987).

Se a fertilização por mais de um espermatozóide ocorrer, o zigoto resultante sofrerá uma divisão anormal e não se tornará viável. O mecanismo de bloqueio da polispermia é altamente conservado entre grupos de animais e é baseado em rápidas modificações da matriz extracelular ovocitária. Esta modificação envolve a liberação do conteúdo dos GC para fora da célula depois que o ovócito é ativado pela liberação de cálcio do RE em resposta à entrada do espermatozóide no citoplasma ovocitário (HALLEY; WESSEL, 2004).

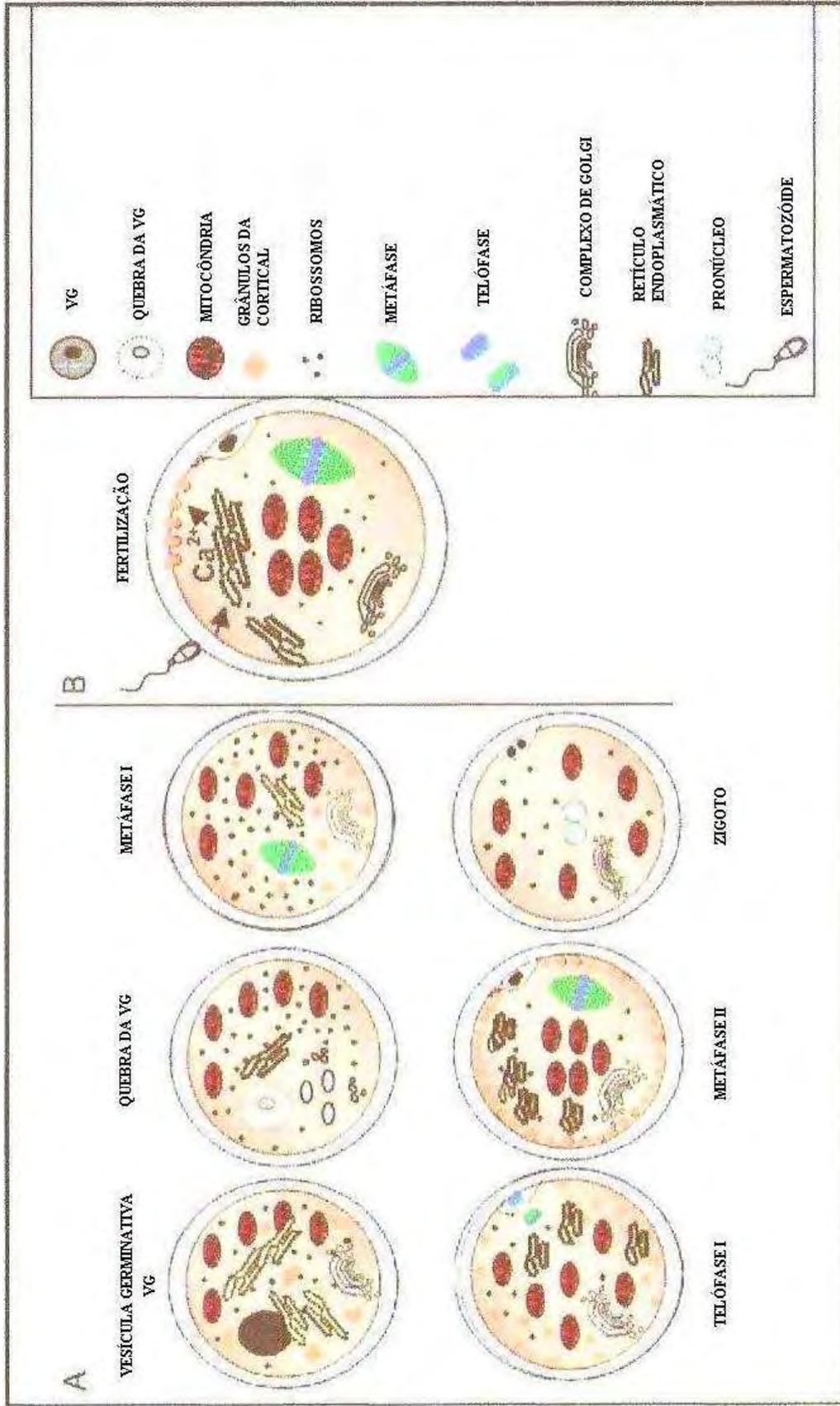


Figura 1.2: Distribuição das organelas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto em bovinos. A) progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de VG até MII e formação do zigoto. B) Distribuição de organelas e mecanismo de liberação dos GC ( $Ca^{2+}$ ) após a entrada do espermatozóide no ovócito durante a fertilização.

Fonte: Ferreira, 2008.

## 2.5 Modificações ultraestruturais do ovócito durante o seu desenvolvimento

Uma forma de avaliar as modificações sofridas pelo ovócito durante seu desenvolvimento é a utilização da microscopia eletrônica de transmissão. A ultraestrutura dos ovócitos é grandemente modificada desde o estágio de folículo primordial até o ovócito maduro. A descrição a seguir trata das modificações sofridas durante o desenvolvimento folicular de ovócitos bovinos.

Durante sua fase de crescimento o ovócito aumenta de, aproximadamente, 30 $\mu$ m (folículo primário) para mais de 120 $\mu$ m (folículo terciário), sendo este aumento acompanhado por acúmulo de RNAm, proteínas, substratos e nutrientes. Nos folículos primários, o ovócito apresenta microvilosidades, as mitocôndrias se alongam e o núcleo é periférico. Nesses folículos a comunicação entre ovócito e células da granulosa ocorre por endocitose através de vesículas recobertas por membranas - “coated pits” (HYTTEL et al., 1997). No folículo secundário, o complexo de golgi é responsável pela produção de grânulos da cortical e pela deposição da zona pelúcida (ZP). Devido ao desenvolvimento da ZP, há um distanciamento do ovócito e células da granulosa. Dessa forma, a partir do estágio de folículo secundário a comunicação intercelular se dá por junções tipo “Gap”. No folículo terciário inicial, há uma multiplicação de mitocôndrias, gotas lipídicas, grânulos da cortical e vesículas que se distribuem por todo o citoplasma. No folículo terciário tardio, as organelas se deslocam para a periferia, aumenta o número de gotas lipídicas e vesículas, assim como o tamanho do complexo de golgi (HYTTEL et al., 1997).

No folículo dominante, as gotas lipídicas e os GC se deslocam para a periferia, sendo esse processo a mudança ultraestrutural que evidencia o início do processo de maturação citoplasmática (CRAN, 1989). Há diminuição no tamanho do complexo de golgi e durante o período pré-ovulatório este diminui ainda mais suas dimensões; a membrana nuclear se torna ondulada e o núcleo vacuolizado (ASSEY et al., 1994a). Além disso, células da corona radiata se alongam provocando sua retração em direção a superfície da membrana do ovócito (FAIR et al., 1995) e há um aumento do tamanho do espaço perivitelínico. Até esse momento as mudanças ocorridas no ovócito são chamadas de pré-maturação ou capacitação, ocorrendo antes do pico de LH (HYTTEL et al., 1997). Sem o pico de LH o folículo começa a regredir entrando em atresia e uma nova onda folicular surge. Com o pico de LH o ovócito entra em sua maturação final que tem como características a expansão das células do cumulus, redução no compartimento do complexo de golgi, aumento no conteúdo lipídico e alinhamento dos grânulos da cortical próximos da membrana do ovócito (HYTTEL et al., 1997).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Atualmente observa-se uma forte expansão da ovinocultura no Brasil e uma demanda cada vez maior de biotecnologias da reprodução que proporcionem a multiplicação da espécie ovina de forma eficiente. A PIVE surge como alternativa para esse objetivo, visto que oferece diversas vantagens frente a outras biotécnicas já amplamente difundidas, como um maior potencial de produção de embriões de uma única doadora, a possibilidade do uso de animais pré-púberes, púberes, gestantes e lactantes como doadores; produção de embriões de fêmeas valiosas que morreram ou que serão destinadas ao abate e o desenvolvimento de pesquisas na área de transferência nuclear e transgênese.

Apesar de ser uma biotécnica bastante eficiente, a PIVE ainda precisa ter suas etapas melhor elucidadas, principalmente no que diz respeito à MIV, por esta ser uma etapa limitante de todo o processo. Tal fato é evidenciado pela constatação por diversos autores de que menos da metade dos ovócitos maturados e fertilizados *in vitro* atingem o estágio de blastocisto.

A maturação do ovócito inclui processos nucleares e citoplasmáticos que coordenados possibilitam o desenvolvimento de embriões viáveis. A avaliação de tais processos através da microscopia eletrônica é uma importante ferramenta que possibilita o entendimento da biologia do ovócito durante a maturação e permite o aprimoramento de biotécnicas como a PIVE.

### **4. OBJETIVO GERAL**

Estudar aspectos ultraestruturais da maturação *in vitro* de ovócitos ovinos visando obter informações que permitam otimizar a utilização de biotécnicas da reprodução nesta espécie.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Descrever os eventos morfológicos ultraestruturais do processo de maturação citoplasmática ao longo de vinte e quatro horas de maturação *in vitro*;

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEL, L. et al. Repeated laparoscopic follicular aspiration in ewe. **Theriogenology**, v. 47, p. 152, 1997 (Abstract).

ASSEY, R. J. et al. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 335-344, 1994a.

ASSEY, R. J. et al. Oocyte steroid and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39 p. 08-16, 1994b.

BALDASSARRE, H. et al. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 145-150, 1994.

BALDASSARRE, H. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 275-284, 2002.

BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 111-124, 1999.

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

BEVERS, M.M., et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p. 54-62, 1995.

BONI, R. et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, p. 277-289, 1997

BRACKETT, B.G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

CAHILL, L. P.; MAULEON, P. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, p. 321-328, 1980.

CHENG, W.T.K. et al. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, v. 25, p.146, 1986.

CRAN, D. G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 49-62, 1989.

CZLONKOWSKA, M. et al. Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 30, p. 34-38, 1991.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19-25, 2005.

DIAS, M. J. et al. Potencialidades da produção de ovinos de corte em Goiás. In: V SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SBMA, 2004.

DRIANCOURT, M.A. et al., Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p. 565-575, 1986.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 55-79, 1991.

DUGGAVATHI, R. **Dynamics and regulation of ovarian antral follicular waves in sheep.** Tese (Doutorado) - University of Saskatchewan, 2004.

EARL, C. R. et al. Ovarian stimulations protocols for oocyte collection and *in vitro* embryo production from 8 to 9 week old lambs. **Theriogenology**, v. 43, p. 203-208, 1995.

EPPIG, J.J., et al. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 976-984, 1997.

EVANS, A. C. O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, p. 699-715, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats.** Sydney, Australia: Butterworths, 1987.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 437-442, 1995.

FAIR, T. et al. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1516-1525, 2001.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, 2008 (Article in press).

FLEMMING, W.N.; SAACKE R. G. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, p. 203-213, 1972.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. *In vitro* embryo production from valuable cows slaughtered for reproductive failure or terminal illness. In: SCIENTIFIC MEETING OF THE EUROPEAN EMBRYO TRANSFER, 9., 1997, Lyon. **Proceedings**. Lyon, 1993. p. 87-89.

GEORGE, L.L et al. **Histologia Comparada**. 2 Ed. São Paulo:Roca, 1998. 286p.

GINTHER, O. J. et al. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, p. 689-703, 1995.

GOODMAN, R. L. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION, 2., 1994, New York. **Proceedings**. New York, 1994. p. 659-709.

GÜLEKLI, B. et al. Accuracy of ovarian reserve tests. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2822-2826, 1999.

HALEY, S. A.; WESSEL, G. M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, p. 2084-2092, 2004.

HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p. 509-522, 2000.

HYTTEL, P. et al. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 645-656, 1986a.

HYTTEL, P. et al. Ultrastructure of human cumulus-oocyte complexes from healthy and atretic follicles. **Human Reproduction**, v. 1, p. 153-157, 1986b.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS – IBGE. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=2&i=P>. Acesso em: Abril de 2008.

KRUIP, T. A. M. et al. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. **Gamete Research**, v. 8, p. 29-47, 1983.

KÜHHOLZER, B. et al. Repeated endoscopic ovum pick up in hormonally untreated ewes: a new technique. **Theriogenology**, v. 48, p. 545-550, 1997.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., et al. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 376-383, 1987.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. et al. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 557-589, 2000.

LOOS, F. DE et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, p. 197-204, 1989.

LOOS, F. DE et al. Structural aspects of bovine oocyte maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 208-214, 1992.

MARIANA, J. C. et al. Folliculogenesis. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in Domestic Animals**. 2. ed. San Diego: Academic Press, p. 119-171, 1991.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, p. 791-799, 2005.

MEIRELLES, F. V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

NOGUEIRA, E. A. et al. Ovinos e caprinos avançam em São Paulo. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4136>. Acesso em: Novembro de 2008.

PETERS, A. R. Herd management for reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.42, p. 455-464, 1996.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 16-21, 1996.

RIZOS, D., et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234-248, 2002.

SEVILLANO, C. et al. *In vitro* development of sheep embryos derived of repeated laparoscopic folliculoaspiration. **Theriogenology**, v. 47, p. 298, 1997 (Abstract).

SHOUBRIDGE, E. A. et al. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 77, p. 87-111, 2007).

SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 777-783, 1990.

STOJKOVIC, M. et al. 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 of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001.

STRICKER, S. A. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 17, p. 303-313, 2006.

SZÖLLÖSI, D. Oocyte maturation. In: REPRODUCTION IN MAMMALS AND MAN. (Eds C. Thibault, C. Levasseur and R.H.F. Hunter), p. 307-325, 1993.

THIBAUT, C., SZÖLLÖSI, D., GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 27, p. 885-896, 1987.

TISDALL, D. J. et al. FSH receptor gene expression during follicle development in sheep. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 273-281, 1995.

TOMEK, W. et al., Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 86-91, 2002.

VAN BLERKOM, J. et al. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization and preimplantation embryogenesis *in vitro*. **Journal of Electron Microscopy Technique**, v. 16, p. 298-323, 1990.

VASCONCELOS, V. R.; VIEIRA, L. S. A evolução da caprino-ovinocultura brasileira. **O Berro**, v. 52, p. 77-78, 2002.

WU, J. et al. *In vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375-381, 2001.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DE OVÓCITOS OVINOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO***

Máximo, D. M.<sup>1</sup>, Silva, I. G. M.<sup>2</sup>, Modadori, R. G.<sup>3</sup>, Neves, J. P.<sup>1</sup>, Lucci, C. M.<sup>1</sup>

Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária<sup>1</sup>

Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas<sup>2</sup>

Universidade Federal de Mato Grosso<sup>3</sup>

Trabalho submetido à publicação na revista *Journal of Reproduction and Development*

**MARÇO/2009**

## RESUMO

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DE OVÓCITOS OVINOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO*.** Déborah Mendes Máximo. Orientador: Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

O objetivo deste trabalho foi descrever e avaliar, através da análise de aspectos ultraestruturais, o processo de maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos ovinos por um período de 24 horas após a inserção de ovócitos imaturos no meio de maturação. Para isso, foram coletados ovários de abatedouro, sendo os folículos aspirados no laboratório. Os complexos *cumulus oophorus* (CCO) selecionados foram divididos em grupos e transferidos para o meio de maturação onde permaneceram por 6, 12, 18 e 24 horas após o início do processo, exceto o tratamento 0 hora. Após a retirada das estruturas nos diferentes tempos de maturação, essas foram processadas para a microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado no tratamento 0 hora que os ovócitos possuíam características compatíveis com estruturas imaturas e após 6 horas de MIV ocorria a migração de mitocôndrias e lipídeos para a periferia citoplasmática e início de expansão das células do cumulus. Tais alterações relacionam-se ao processo de aumento de atividade metabólica ovocitária e início do processo de maturação que levará o ovócito até o estágio de metáfase II. Entre 12 e 18 horas de MIV foram observados rearranjos citoplasmáticos de organelas, tais como o alinhamento e aumento dos grânulos da cortical associados à membrana plasmática, que permitiram inferir sobre o processo de maturação nuclear, sugerindo que, nessa espécie, 18 horas de MIV seriam suficientes para o ovócito atingir sua maturação citoplasmática e nuclear e ser fertilizado. Foi observado também a presença de mitocôndrias do tipo *hooded* em alguns momentos da maturação. Tais estruturas são comumente encontradas em ovócitos de outras espécies e podem estar relacionadas há um aumento da atividade metabólica mitocondrial durante o período de migração de organelas. Após 24 horas de MIV, os ovócitos avaliados apresentavam características de degeneração o que pode estar ligado ao envelhecimento desta célula devido à sua permanência por mais 6 horas no meio MIV depois da aquisição de competência para a fertilização *in vitro* (FIV). Este trabalho permitiu a avaliação de aspectos ultraestruturais da MIV em ovinos, bem como forneceu conhecimentos a respeito da maturação nuclear. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para aprimorar essa importante biotécnica nessa espécie.

Palavras chave: microscopia eletrônica de transmissão, mitocôndrias *hooded*, produção *in vitro* de embriões.

## ABSTRACT

### **ULTRASTRUCTURE CHARACTERISTICS OF SHEEP OOCYTES DURING *IN VITRO* MATURATION.** Déborah Mendes Máximo. Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

The aim of this study was describe and evaluate, by analysis of ultrastructural aspects, the *in vitro* maturation (IVM) process of the sheep oocytes during 24 hours after insertion of immature oocytes in maturation medium. For this, ovaries were collected from slaughterhouse and its follicles were aspirated on laboratory. The selected cumulus oocyte complex (COC) were divided into groups and transferred to the maturation medium where they were maintained for 6, 12, 18 and 24 hours after the beginning of process, except the 0 hour treatment. The structures were removed after different maturation times and processed to transmission electron microscopy. In 0 hour treatment the oocytes had compatible characteristics with immature structures and, after 6 hours of IVM, there was migration of mitochondrias and lipids to the cytoplasm periphery and the onset of cumulus cells expansion. These alterations were compatible with increasing metabolic activity on oocyte and the onset of maturation process that enable the structure to reach metaphase II. Between 12 and 18 hours of IVM, were observed cytoplasmic rearrangements of organelles, like aligning and increasing of cortical granules associated with plasmatic membrane, that were related to the process of nuclear maturation, suggesting that, in this specie, 18 hours of IVM were enough to the oocyte reach nuclear and cytoplasmic maturation and be fertilized. The presence of hooded mitochondrias in some times of maturation was observed. These structures were commonly found on other species oocytes and could be related to increase of mitochondrial activity metabolic during organelles migration. After 24 hours of IVM, the oocytes had characteristics of degeneration that can be related to cellular aging because of the persistence on the maturation medium after acquisition competence to *in vitro* fertilization (IVF). This work enabled the evaluation of the ultrastructural aspects of sheep IVM and provide knowledge about the nuclear maturation. However, more studies must be performed to refine this important biotechnique in sheeps.

Key words: transmission electron microscopy, hooded mitochondrias, *in vitro* embryo production.

## 1. INTRODUÇÃO

Assim como na espécie bovina, os procedimentos de aspiração folicular, MIV, FIV e CIV permitem a exploração do potencial reprodutivo das fêmeas ovinas de maneira inédita. A PIV de embriões oferece ainda a possibilidade de aceleração do ganho genético por meio da redução do intervalo entre gerações e a maximização do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético (LOHUIS, 1995), principalmente, quando são utilizadas doadoras jovens (EARL et al., 1995; BALDASSARRE et al., 1996).

Além disso, a PIV fornece uma fonte econômica e abundante (a partir de ovários colhidos em abatedouros) de ovócitos maturados, zigotos e embriões a serem utilizados com fins de pesquisa básica em fisiologia do desenvolvimento, na reprodução de animais de produção e para aplicação comercial de biotécnicas emergentes, tais como a sexagem de embriões (O'BRIEN et al., 2004), injeção intracitoplasmática de espermatozóide (WANG et al., 2002), transferência nuclear e transgênese (BALDASSARRE et al., 2002).

Avanços no conhecimento sobre a maturação final dos gametas (MERMILLOD et al., 1999), pesquisas sobre diferentes condições de cultivo para a maturação ovocitária (CÓGNIE et al., 2003) e desenvolvimento embrionário em ruminantes (THOMPSON, 2000) favoreceram o progresso substancial nos sistemas de PIV. Apesar da produção *in vitro* ser documentada em pequenos ruminantes (ALBERIO et al., 2002; BERLINGUER, et al., 2006), os resultados de cultivo *in vitro* apresentam um avanço limitado e esta técnica ainda não é utilizada como rotina nessa espécie.

Um dos pontos cruciais da PIVE é o processo de maturação ovocitária, pois é nessa etapa que o ovócito adquire competência, ou seja, ele se torna capaz de completar a maturação, ser fertilizado e suportar o desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL et al., 1997; SIRARD, 2006). A maturação ovocitária é um longo processo durante o qual os ovócitos adquirem a habilidade de progredir através dos eventos subsequentes de desenvolvimento que envolve complexos e distintos, embora interligados, mecanismos de maturação nuclear e citoplasmática (FERREIRA et al., 2008).

O conhecimento das modificações ultraestruturais durante a MIV de diferentes espécies contribui para o entendimento da biologia do ovócito e permite a obtenção de melhorias nos sistemas de MIV e FIV espécie-específicos. Portanto, o objetivo do presente estudo é investigar os aspectos relacionados à maturação citoplasmática *in vitro* da espécie ovina.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta e manipulação dos ovários**

Os ovários foram coletados no abatedouro L&M, localizado em Santo Antônio do Descoberto – GO, distante aproximadamente uma hora e meia do laboratório onde foram processados. Imediatamente após o abate, os ovários foram mantidos em solução fisiológica entre 30°C e 35°C. Ao chegar ao laboratório, estes foram lavados em solução fisiológica pré-aquecida e mantidos nessa mesma solução em banho-maria a 35°C durante o processo de aspiração folicular. As aspirações foliculares e maturação *in vitro* dos ovócitos obtidos foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal das Faculdades Integradas – UPIS localizado no Campus de Planaltina, Brasília, DF.

### **2.2 Aspiração folicular e recuperação dos ovócitos**

Os folículos foram aspirados com a utilização de uma agulha de calibre 21G acoplada a uma bomba de pressão a vácuo (40mmHg). O fluido folicular foi depositado em um tubo de coleta estéril mantido em banho-maria a 35°C. O líquido coletado foi transferido para placa de petri mantida em placa aquecedora e, os CCOs foram classificados sob estereomicroscópio e somente as estruturas consideradas de qualidade I (ovócitos contendo mais de três camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo) e II (ovócitos com duas ou três camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo) foram selecionadas (BLONDIN; SIRARD, 1995).

### **2.3 Maturação *in vitro***

As estruturas selecionadas foram divididas em grupos de 4 a 6 CCOs e transferidos para gotas de 150 µl do meio de maturação (Nutricell®), cobertas com óleo mineral, previamente estabilizadas por 2 horas em incubadora a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub>, com umidade saturada. Em torno de 5 estruturas foram removidas das gotas do meio de maturação às 6, 12, 18 e 24 horas após o início do processo, exceto o tratamento 0 hora.

## **2.4 Processamento dos CCOs para microscopia eletrônica**

Após a retirada das estruturas nos diferentes tempos de maturação, e previamente ao início do processo, essas foram transferidas para a solução de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1M com pH 7,2) a 4°C por 24 horas, sendo então colocados no tampão cacodilato 0,1M onde permaneceram a 4°C até o processamento no Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB – UnB.

A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 2,5 mM por 1 h no escuro. Depois o material foi contrastado *in block* com acetato de uranila 0,5% e desidratado em concentrações crescentes de acetona e incluído em resina Spurr. Os cortes semi-finos (3µm) foram corados com azul de toluidina para observação da região equatorial dos ovócitos. Os cortes ultra-finos foram colocados sobre telas de cobre e observados, posteriormente, no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011, Jeol, Tóquio, Japão).

## **2.5 Análise**

No microscópio eletrônico de transmissão foram observadas as organelas citoplasmáticas, como o núcleo, as mitocôndrias, as gotas de lipídeos, as vesículas e os grânulos da cortical. O aspecto da distribuição e associação entre tais organelas também eram avaliados. Além disso, observou-se a zona pelúcida e o contato desta com o citoplasma através das microvilosidades; a disposição e o formato das células da granulosa.

### 3. RESULTADOS

Os ovócitos imaturos obtidos de folículos em fase antral correspondentes ao tratamento “0 hora” apresentaram células do cumulus em formato cilíndrico e compactadas (Figura 2.1A). No ovócito, mitocôndrias pleomórficas se encontravam dispostas em pequenos grupos por todo o citoplasma, sendo a maioria deles concentrados na periferia deste. As gotas lipídicas geralmente encontravam-se associadas aos grupos de mitocôndria (Figura 2.1B). Foi observado um moderado número de vesículas de tamanhos variados (pequenas e médias) dispersas pelo citoplasma e o núcleo com localização periférica (Figura 2.1C). O espaço perivitelínico estava presente e associado a pequenas microvilosidades.

Após seis horas de maturação *in vitro*, havia um aumento do espaço entre as células do cumulus e um pequeno aumento do espaço perivitelínico, assim como da quantidade e tamanho das microvilosidades que se projetavam em direção à zona pelúcida (Figura 2.2A e B). As mitocôndrias, em formatos variados, sendo a maioria em “capuz” (*hooded*) estão dispostas em grupos maiores na periferia do citoplasma associadas a gotas lipídicas. Vesículas continuavam presentes em grande quantidade distribuídas por todo o citoplasma do ovócito (Figura 2.2B e C).

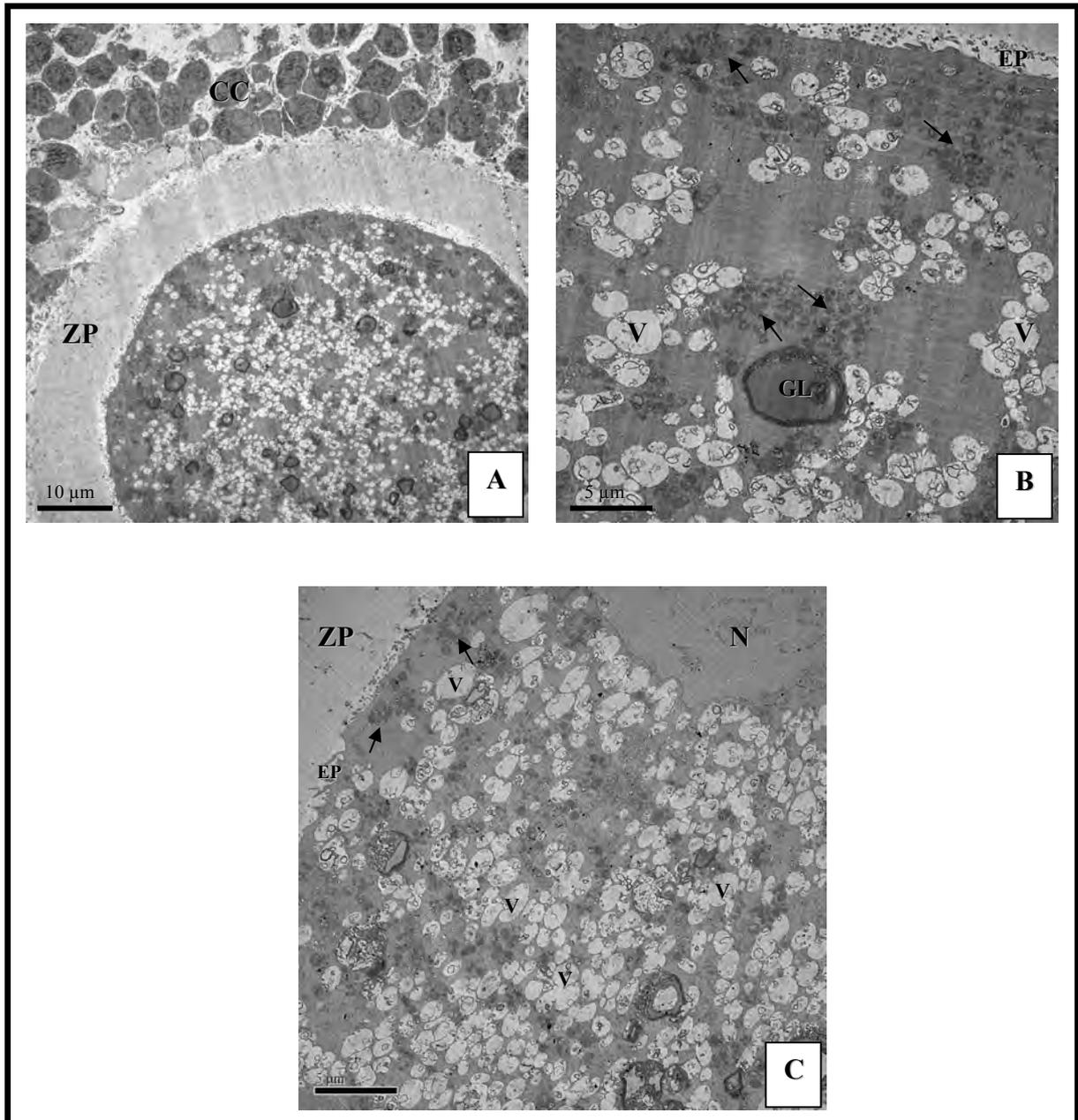


Figura 2.1: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos imaturos, tempo 0 hora. A) Imagem do aspecto geral do citoplasma e da disposição compactada das células do cumulus. B) Imagem do citoplasma do ovócito onde se observa a concentração de pequenos grupos de mitocôndrias na periferia do citoplasma (setas) e sua associação com gotas lipídicas. C) Imagem do citoplasma do ovócito onde o núcleo possui localização periférica e vesículas de tamanhos variados se encontram dispersas pelo citoplasma. Observar o espaço perivitelínico reduzido e com pequenas microvilosidades. CC – células do cumulus; ZP – zona pelúcida; EP – espaço perivitelínico; GL – gota lipídica; V – vesícula; N – núcleo.

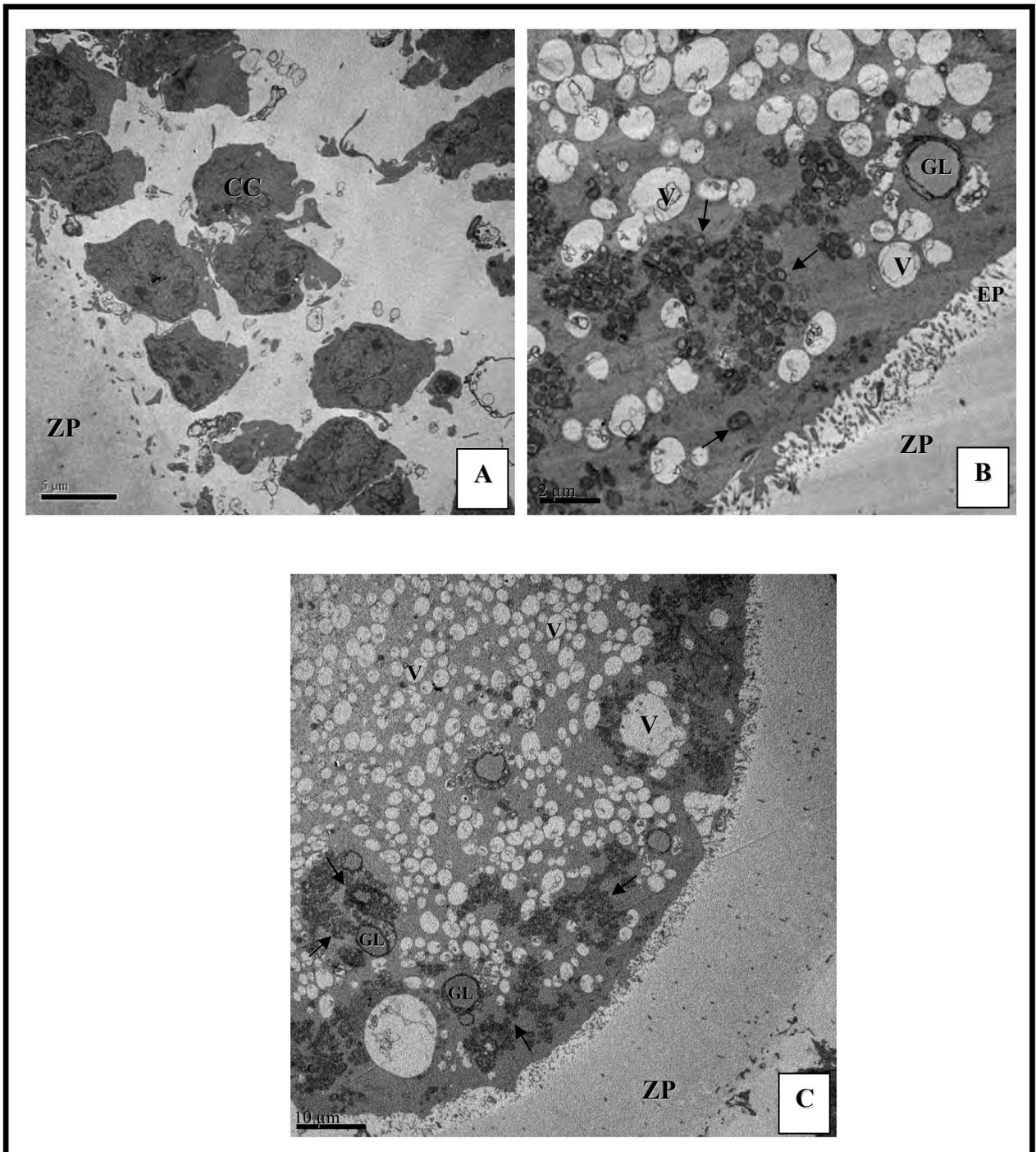


Figura 2.2: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 6 horas de MIV. A) Imagem das células do cumulus as quais apresentam um maior espaçamento entre si. B) Citoplasma do ovócito contendo grupos maiores de *hooded* mitocôndrias (setas) dispostas na periferia. Observar o aumento do espaço perivitelínico e das microvilosidades que se projetam para a zona pelúcida. C) Imagem do citoplasma do ovócito evidenciando grupos periféricos de mitocôndrias (setas), geralmente associadas a gotas lipídicas. CC – células do cumulus; ZP – zona pelúcida; EP – espaço perivitelínico; GL – gota lipídica; V – vesícula.

Após doze horas de maturação, as mitocôndrias distribuía-se pelo citoplasma iniciando o processo de disposição em “teias” (Figura 2.3A) e as gotas lipídicas se concentravam na periferia (Figura 2.3A e 2.3B). Havia o alinhamento dos grânulos da cortical na periferia do citoplasma localizados em intervalos regulares junto à membrana plasmática (Figura 2.3 B).

Após dezoito horas de maturação havia um maior espaçamento entre as células do cumulus (Figura 2.4A). No ovócito havia aumento do número de grânulos da cortical em íntimo contato com a membrana citoplasmática (Figura 2.4B). As mitocôndrias encontravam-se dispostas ao redor de pequenas regiões menos eletrondensas do citoplasma e a maioria possuíam formato em “capuz” (*hooded*). Havia também uma diminuição do número de vesículas dispersas pelo citoplasma e as gotas lipídicas retornavam a uma posição mais interna (Figura 2.4B).

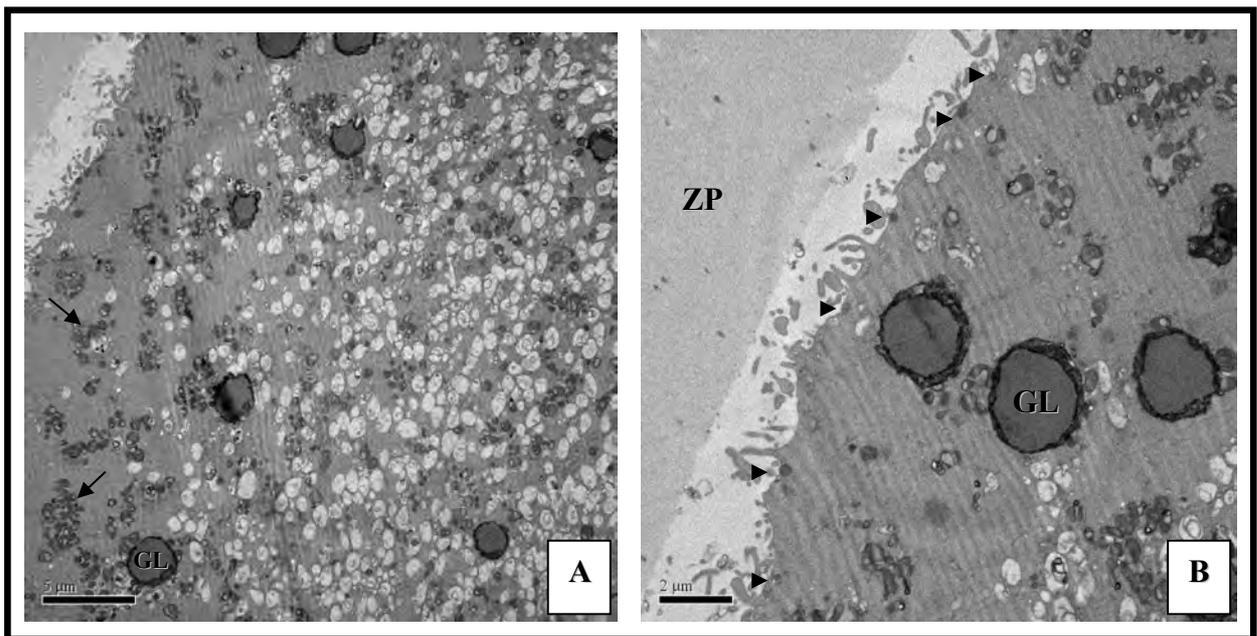


Figura 2.3: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 12 horas de MIV. A) Imagem do citoplasma do ovócito no qual se observa o início do processo de disposição das mitocôndrias (setas) organizadas em “teias”. B) Imagem do citoplasma do ovócito mostrando a disposição de gotas lipídicas na periferia e o alinhamento dos grânulos da cortical junto à membrana plasmática (cabeça de seta). GL – gota lipídica; ZP – zona pelúcida.

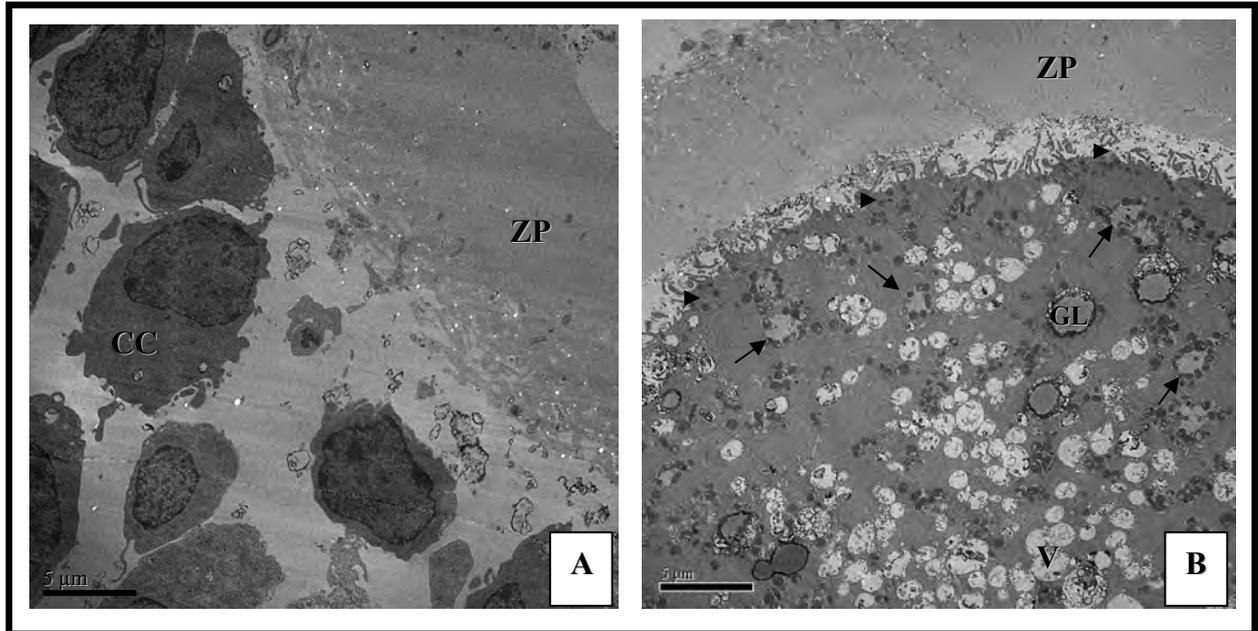


Figura 2.4: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 18 horas de MIV. A) Imagem das células do cumulus e zona pelúcida do ovócito. Observar o maior espaçamento entre as células do cumulus. B) Imagem do citoplasma do ovócito onde as setas indicam as mitocôndrias dispostas ao redor de pequenas regiões menos eletrondensas do citoplasma. Observar também a diminuição de vesículas e a retomada da posição mais interna das gotas lipídicas. As cabeças de seta mostram grânulos da cortical em íntimo contato com a membrana plasmática. CC – células do cumulus; ZP – zona pelúcida; GL – gota lipídica.

Após vinte e quatro horas de maturação *in vitro*, observava-se o alongamento das células do cumulus e o espaço entre estas preenchido por material de secreção, sugestivo de ácido hialurônico (Figura 2.5A). As mitocôndrias não possuíam nenhum padrão de distribuição como observado nos tratamentos anteriores, havia também o reaparecimento de gotas lipídicas concentradas na periferia do citoplasma e indícios de retração citoplasmática (Figura 2.5B).

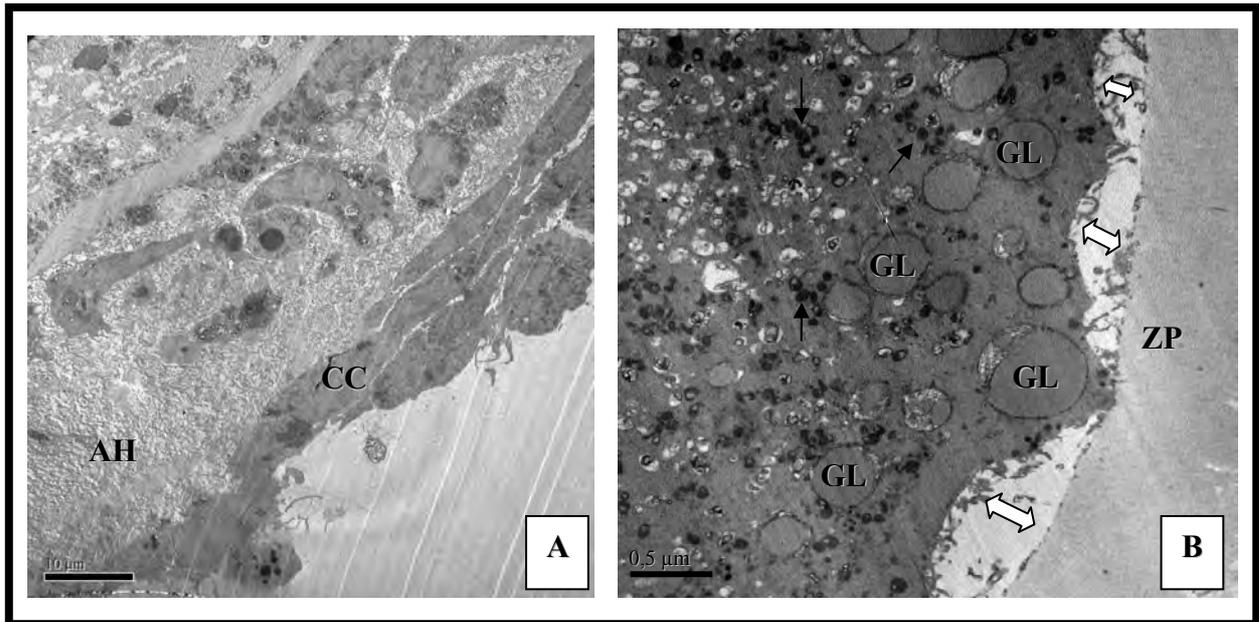


Figura 2.5: Características ultraestruturais de ovócitos ovinos após 24 horas de MIV. A) Imagem das células do cumulus evidenciando o alongamento destas células e o espaço entre elas preenchido por material de secreção, sugestivo de ácido hialurônico. B) Imagem do citoplasma do ovócito onde há gotas lipídicas (GL) concentradas na periferia do citoplasma. As setas indicam mitocôndrias sem qualquer padrão de distribuição. Observar também os pontos de retração citoplasmática (seta larga) CC – células do cumulus; AH – provável ácido hialurônico; ZP – zona pelúcida.

#### 4. DISCUSSÃO

Os ovócitos obtidos de folículos em fase antral, correspondentes ao tratamento “0 hora”, apresentaram características compatíveis com estruturas imaturas descritas por Cran et al. (1980) em ovinos e por diversos autores em outras espécies (CRAN, 1985; HYTTEL et al., 1986; ALVARENGA, 2006; MONDADORI, 2008). A disposição de organelas descrita, como grupos de mitocôndrias, geralmente associadas a gotas lipídicas, dispersas pelo citoplasma e células do cumulus em formato cilíndrico e próximas umas das outras condizem com um ovócito imaturo que ainda precisa ser ativado, neste caso, por fatores presentes no meio de maturação *in vitro* e pela ausência de inibidores do fluido folicular, para que haja continuidade do processo de maturação.

Após 6 horas de MIV algumas alterações citoplasmáticas já são perceptíveis neste trabalho, como a migração de grupos de mitocôndrias e lipídeos para a periferia do citoplasma. Esta redistribuição de organelas pode estar relacionada ao início do processo de

maturação citoplasmática, necessário para que o ovócito alcance o estágio de metáfase II. De acordo com Mondadori (2008), o preparo do ovócito para o reinício da meiose se dá com este aumento da atividade metabólica evidenciado pela localização periférica de organelas. Essa migração de organelas para a periferia citoplasmática também pode estar relacionada à transmissão de sinais entre ovócito e células do cumulus que pode ocorrer tanto por junções do tipo “Gap” como de forma parácrina (DEKEL e BEERS, 1980; LUCIDI et al., 2003). De acordo com estes autores, substâncias de baixo peso molecular como, íons, nucleotídeos e aminoácidos podem atravessar das células do cumulus para o ovócito e vice-versa através de junções tipo “Gap”. Há também evidências de que tais trocas não dependem de tal contato físico entre células do cumulus e citoplasma ovocitário, ou seja, substâncias solúveis podem ser transportadas de um local para o outro apenas por difusão (LUCIDI et al., 2003).

Comparando-se o estágio anterior da maturação (tratamento 6 horas) com as imagens obtidas após 12 e 18 horas de maturação evidencia-se uma migração de organelas citoplasmáticas, mitocôndrias e lipídeos, da periferia para uma região mais interna do citoplasma. Tal observação condiz com análises ultraestruturais de ovócitos bovinos submetidos à MIV, as quais mostram que as mitocôndrias se deslocam de uma posição periférica para uma distribuição mais dispersa pelo citoplasma após 12 a 18 horas de cultivo (HYTTEL et al., 1986). Este evento é similar ao que ocorre com as mitocôndrias *in vivo*, que envolve uma distribuição periférica antes do surgimento do LH, formação de grupos na cortical nos estágios finais da maturação nuclear e uma distribuição dispersa após a extrusão do corpúsculo polar, aproximadamente 19 horas após o surgimento do LH (HYTTEL et al., 1986; FERREIRA et al., 2008).

Além da redistribuição de mitocôndrias e lipídeos, após 12 horas de maturação, há o alinhamento dos grânulos da cortical na periferia do ovócito e 6 horas depois (18 horas) há um aumento no número desses grânulos, os quais se encontram intimamente associados com a membrana plasmática. Tal constatação coincide com a de Hosoe e Shioya (1997) os quais descreveram que para ovócitos bovinos no estágio de vesícula germinativa, os grânulos da cortical se distribuem em grupos dispostos pelo citoplasma e no final do período de maturação, quando o ovócito atinge o estágio de MII, os grânulos encontram-se distribuídos em íntimo contato com a membrana plasmática, uma forma estratégica de arranjo para esperar pela entrada do espermatozóide (THIBAUT et al., 1987; CONNER et al., 1997).

Como visto, as descrições da redistribuição de organelas ao longo da MIV permitem fazer inferências, tanto a respeito do estágio de maturação citoplasmática quanto nuclear em que o ovócito se encontra. No presente trabalho, apesar de não ter sido feita a avaliação da

maturação nuclear através da constatação por imagens da extrusão do primeiro corpúsculo polar, é possível inferir que o ovócito tenha atingido esse estágio com 18 horas de MIV baseado na configuração das organelas. Sendo assim, sugere-se que ovócitos ovinos já estariam prontos para a etapa de FIV com apenas 18 horas de MIV, diferente do tempo de MIV utilizado para bovinos, de 22 a 24 horas (GONÇALVES, 2008). Tal especulação já poderia justificar a importância de protocolos de PIVE espécie-específicos, onde tempos de cultivo e composição de meios devem ser ajustados para diferentes espécies.

Após 24 horas de MIV os ovócitos apresentavam características de degeneração, como a retração e o aspecto de granulação do citoplasma, além da desorganização apresentada pelas mitocôndrias que já não possuíam nenhum padrão de distribuição. Tais alterações podem ser devidas à aquisição de competência ovocitária para fertilização já nas 18 horas após o início da MIV. Neste caso, a permanência por mais 6 horas no meio de maturação (24 horas) proporcionaria danos irreversíveis ao ovócito devido ao seu envelhecimento decorrido de um tempo excessivo no meio de MIV. De acordo com Long et al. (1994), Hunter e Greve (1997), um maior tempo de cultivo ovocitário pode desorganizar estruturas nucleares e citoplasmáticas resultando em erros de pareamento de cromossomos e queda na fecundação.

No presente trabalho, observou-se que as mitocôndrias eram pleomórficas e a maioria delas possuía o formato *hooded* após 6 horas de MIV. Esse formato caracteriza-se pela projeção de um pequeno apêndice sobre a mitocôndria formando um arco ou capuz. Esse aumento da superfície mitocondrial pode estar relacionado a um aumento da atividade metabólica mitocondrial durante o período de migração de organelas que caracterizam a maturação citoplasmática e nuclear. De acordo com Senger e Saacke (1970), esse tipo de mitocôndria também é freqüentemente encontrado em ovócitos de pequenos e grandes folículos bovinos e, como visto neste trabalho, também se encontra geralmente associada a lipídeos. Essa associação observada pode ser devida à utilização dos lipídeos como fonte energética pelas mitocôndrias durante períodos que requerem alta síntese de energia por esta organela, como foi visto nas fases iniciais da maturação em que o ovócito progride até a extrusão do corpúsculo polar. As regiões menos eletrodensas visualizadas 18 horas após a MIV podem ser “vazios” deixados pelo consumo de gotas lipídicas pelas mitocôndrias que as circundavam nos tempos anteriores da MIV. Portanto, sugere-se que as mitocôndrias teriam alto metabolismo até as 18 horas, pois até este momento o ovócito estaria passando por grandes transformações relacionadas ao processo de maturação, utilizando como fonte de energia os lipídeos. Após esse tempo o ovócito entraria numa fase de menor metabolismo devido à aquisição de competência para a FIV.

Os ovócitos selecionados para a MIV neste trabalho possuíam mais de duas camadas de células do cumulus, pois estas desempenham importante função durante a MIV e subsequente desenvolvimento do ovócito. Shirazi et al. (2007) concluíram que a habilidade de ovócitos ovinos reiniciarem a meiose na ausência de uma conexão inicial entre células do cumulus e o ovócito é drasticamente interrompida. Portanto, para uma correta maturação, é imprescindível o contato físico entre ovócito e células do cumulus.

Durante o processo de MIV as células do cumulus sofreram modificações tanto de forma quanto de disposição, ou seja, ao longo do processo tais células se alongavam e distanciavam-se umas das outras. Além disso, foi observado o acúmulo de material de secreção entre estas células ao final da MIV. De acordo com Gonçalves et al. (2008), durante a maturação nuclear e citoplasmática as células do cumulus tornam-se suspensas em uma matriz de muco, permanecendo separadas em função do acúmulo desse muco rico em ácido hialurônico. Hormônios endógenos e fatores produzidos pelo ovócito estimulam a síntese de ácido hialurônico pelas células do cumulus, induzindo a expansão do cumulus durante o período de maturação. Tais fatos explicam o ocorrido no presente trabalho com relação às células do cumulus e pode-se inferir que essas apresentam evolução característica durante o processo de MIV.

O meio de maturação utilizado neste estudo foi fornecido pela empresa Nutricell® e é o meio utilizado rotineiramente na PIV de embriões bovinos. Apesar de existirem alguns relatos da evolução dos protocolos de PIV de embriões ovinos (DEMATOS et al., 1999; GULER et al., 2000), optou-se por trabalhar com um meio já bem estabelecido na PIV de embriões de bovinos, haja vista sua utilização na PIVE de outras espécies de ruminantes (búfalo – MONDADORI, 2008). Apesar de não haver relatos sobre a utilização desse meio antes, o meio se mostrou capaz de fornecer as condições mínimas necessárias para promover a maturação ovocitária em ovinos. Baseado nos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que outros trabalhos sejam realizados com o objetivo de aprimorar protocolos de MIV para ovinos.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho promoveu a descrição dos eventos morfológicos ultraestruturais do processo de maturação citoplasmática ao longo de vinte e quatro horas de maturação *in vitro* da espécie ovina, assim como permitiu a avaliação da possível aquisição de competência ovocitária através da visualização das mudanças citoplasmáticas ocorridas durante a MIV. Além disso, a observação dos aspectos de rearranjo de organelas citoplasmáticas permitiu fazer inferências a respeito da maturação nuclear do ovócito ovino, sendo que, tais avaliações devem ser confirmadas através de estudos que contemplem a etapa da FIV.

Mais estudos são necessários para que a MIV na espécie ovina seja aprimorada. Avaliações a respeito de taxas de maturação, comparação entre diferentes meios de MIV e substâncias que adicionadas a este promovam melhores resultados na produção de embriões, dentre outros, devem ser consideradas etapas importantes para o futuro da PIVE em ovinos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBÉRIO, R. et al. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 81-87, 2002.
- ALVARENGA, F. C. L. Structural aspects of equine oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 23, p. 513-524, 2006.
- BALDASSARRE, H. et al. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v. 45, p. 707-717, 1996.
- BALDASSARRE, H. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 275-284, 2002.
- BERLINGUER, F. et al. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte development competence in FSH-treated ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, 2006 (Article in press).
- BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p. 54-62, 1995.
- COGNIÉ, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, p. 171-188, 2003.
- CONNER, S. et al. Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. **Development**, v. 48, p. 106-118, 2006.
- CRAN, D. G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 237-245, 1985.
- CRAN, D.G. et al. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 125-132, 1980.
- DEKEL, N.; BEERS, W. H. Development of rat oocytes *in vitro*: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of cumulus-oophorus. **Developmental Biology**, v. 75, p. 247-254, 1980.
- DEMATOS, D. G. et al., Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of ovine oocytes: effect of cysteamine and  $\beta$ -mercaptoethanol. **Theriogenology**, v. 51, p. 368-372, 1999.
- EARL, C. R. et al. Ovarian stimulations protocols for oocyte collection and *in vitro* embryo production from 8 to 9 week old lambs. **Theriogenology**, v. 43, p. 203-208, 1995.
- FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, 2008 (Article in press).

GONÇALVES, P. B. D. et al. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2 Ed. São Paulo:Roca, 2008. 395p.

GULER, A. et al., Effect of growth factors, EGF and EGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep. **Theriogenology**, v. 54, p. 209-218, 2000.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371-376, 1997.

HUNTER, R.H.F; GREVE, T. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, p. 137-141, 1997.

HYTTEL, P. et al. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 615-625, 1986.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

LOHUIS, M. M. Potencial benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v. 43, p. 51-80, 1995.

LONG, C. R. et al. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 361-369, 1994.

LUCIDI, P. et al. Cumulus cell steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 45, 2003.

MERMILLOD, P. et al. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 449-460, 1999.

MONDADORI, Rafael Gianella. **Foliculogênese, maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bubalinos – *Bubalus bubalis* – uma análise estrutural**. Brasília: Departamento de Biologia Celular, 2008. 120p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, 2008.

O'BRIEN et al. *In vivo* development capacity of *in vitro* produced embryos derived from sex-sorted and re-cryopreserved frozen-thawed ram sperm. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 16, p. 286, 2004.

SENGER, P. L; SAACKE, R. G. Unusual mitochondria of the bovine oocyte. **The Journal of Cell Biology**, v. 46, p. 405-408, 1970.

SHIRAZI, A. et al. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during *in vitro* maturation. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 291-295, 2007.

SIRARD, M.A., et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

THIBAULT, C., SZÖLLÖSI, D., GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 27, p. 885-896, 1987.

THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 263-275, 2000.

WANG, B. et al. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 437-443, 2002.