

**PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ESTRUTURAS OVARIANAS DE OVELHAS
PELA TÉCNICA DE COLORAÇÃO AGNOR**

THAÍS ANDRESSA HERNANDES ARREBOLA

**PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ESTRUTURAS OVARIANAS DE OVELHAS
PELA TÉCNICA DE COLORAÇÃO AgNOR**

THAÍS ANDRESSA HERNANDES ARREBOLA

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

636.089
A774p

Arrebola, Thaís Andressa Hernandes

Proliferação celular das estruturas ovarianas de ovelhas pela técnica de coloração AgNOR / Thaís Andressa Hernandes Arrebola. - Presidente Prudente, 2011.
61 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE,
Presidente Prudente – SP, 2011.

Bibliografia.

Orientador: Marcelo George Mungai Chacur.

1. Ovis aries – Anatomia ovariana. 2.
Proliferação celular. 3. Técnica AgNOR. I. Título

THAÍS ANDRESSA HERNANDES ARREBOLA

**PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ESTRUTURAS OVARIANAS DE OVELHAS
PELA TÉCNICA DE COLORAÇÃO AgNOR**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 24 de outubro 2011.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Londrina - PR

Prof.^a Dr.^a Caliê Castilho Silvestre
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Kátia e Jaime, que estiveram sempre ao meu lado e me ajudaram em todos os momentos de realização dessa pesquisa.

Ao meu irmão Thiago, por estar presente nos momentos mais difíceis e pela confiança e otimismo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador, Dr. Marcelo Chacur que, com muita paciência, me guiou para a concretização desse trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Seneda, que me ensinou durante a graduação.

Ao professor Dr. Osimar Sanches, ao professor Dr. Luís Roberto e ao amigo Daniel, pela ajuda prestada.

Aos professores do curso de Mestrado em Ciência Animal da Unoeste, pelos ensinamentos oferecidos.

À amiga Cléo, pela presteza e paciência em ajudar.

Aos amigos próximos e aos distantes, pelo carinho e conforto.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

RESUMO

Proliferação celular de estruturas ovarianas de ovelhas pela técnica de coloração AgNOR

A ovinocultura atualmente ocupa um lugar de importância dentro dos criatórios de interesse zootécnico, sendo necessário o desenvolvimento de estudos na área de reprodução, relativos aos ovinos criados em clima tropical. Raças lanadas, em sua maioria possuem estacionalidade reprodutiva, ou seja, os ciclos são controlados pela diminuição da luminosidade da estação, já ovelhas mestiças geralmente possuem atividade reprodutiva geralmente observada durante todo o ano. A córtex ovariana possui os folículos e corpos lúteos em vários estádios de desenvolvimento, sustentada por tecido conjuntivo e fibras musculares lisas em meio a vasos e nervos. A medula ovariana é formada de tecido conjuntivo fibroelástico, nervos e artérias, compreendendo a parte mais interna do ovário. Em folículos antrais, o IGF estimula a proliferação, atividade e diferenciação das células da granulosa e a esteroidogênese. As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são alças de ácido desoxirribonucléico (DNA) responsáveis por sintetizar ácido ribonucléico ribossomal (RNAr) durante a intérfase, período de síntese protéica e de aumento de volume, tamanho e número de organelas da célula. É no nucléolo, localizado no núcleo celular, que há armazenamento e produção de RNAr, que ligados à várias proteínas irão formar os ribossomos. A técnica AgNOR avalia as NORs de cromossomos ativos durante o ciclo celular e o número ou área das NORs mostram essa atividade proliferativa, a partir da fase G1, de intensa produção de proteínas e RNA, até o máximo na fase S, de síntese do DNA, do ciclo.

Palavras-chave: *Ovis aries*. Anatomia ovariana. Proliferação celular. Técnica AgNOR

ABSTRACT

Proliferation of ovarian cell structures of ewes by the technique of AgNOR staining

The sheep industry now occupies an important place of interest within the livestock farms, requiring the development of studies in the area related to sheep breeding on tropical climate. Most of the wool breed have reproductive seasonality, in other words, cycles are controlled by the fading light of the season, on the other hand crossbred sheep usually have already observed reproductive activity throughout the year. The ovarian cortex has follicles and corpus luteum in various stages of development, supported by connective tissue and smooth muscle fibers through the vessels and nerves. The ovarian marrow is made up of fibroelastic tissue, nerves and arteries, being the innermost part of the ovary. In antral follicles, IGF stimulates the proliferation activity and differentiation of granulosa cells and steroidogenesis. The nucleolar organizer regions (NORs) are loops of deoxyribonucleic acid (DNA) responsible for synthesizing ribosomal ribonucleic acid (rRNA) during interphase, the period of protein synthesis and increase in volume, size and number of cell organelles. It is in the nucleolus, located in the cell nucleus, which has storage and production of rRNA, which will be linked to various proteins to form ribosomes. The AgNOR technique evaluates the NORs of active chromosomes during the cell cycle and the number or area of NORs show that proliferative activity, from the G1 phase of intense production of proteins and RNA, to the maximum in S phase, that have synthesis of DNA, of the cycle.

Key Words: *Ovis aries*. Ovarian anatomy. Cellular proliferation. AgNOR technique

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Anatomia e Histologia do Ovário	12
2.2 Estacionalidade e Ciclo Reprodutivo	15
2.3 Fatores Promotores de Crescimento	18
2.4 Técnica de coloração AgNOR	19
REFERÊNCIAS	22
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	27

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira, predominante na região Nordeste do país, tem se expandido bastante com a demanda para a produção de carne e peles (SIMPLICIO; SALLES; SANTOS, 2002).

Segundo o Anuário da Pecuária Brasileira (2010), no ano de 2008 havia um rebanho de 453.261 mil cabeças de ovinos no estado de São Paulo dentro de 16.628.571 milhões no Brasil, em comparação com o ano de 2000, com 233.681 mil no estado paulista e de 14.784.958 milhões no país, mostrando uma crescente expansão com cerca de 52% no período de oito anos.

As biotécnicas da esfera reprodutiva podem se beneficiar com o conhecimento da anatomia e da histologia dos ovários (TRALDI, 2006).

Os órgãos genitais femininos responsáveis pelo crescimento e maturação dos oócitos são os ovários. Na ovelha, as gônadas têm forma de amêndoa com cerca de 1,5cm de comprimento e peso em torno de 3 a 4 g (SISSON, 1986), são constituídos por epitélio germinativo escamoso ou cubóide simples que circunda a córtex (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A estrutura e proliferação celular dos folículos em desenvolvimento, presentes na córtex, é diferente para cada estágio e podem variar em tamanho de 40µm a 5,5mm de diâmetro (HEMAMALINI et al., 2003; URIBE-VELASQUEZ; OBA; SOUZA, 2008).

As células do corpo lúteo (CL) se originam das células da teca interna e da membrana granulosa com hipertrofia e hiperplasia, sendo denominadas células luteínicas pequenas e grandes, respectivamente (FITZ et al., 1982).

De forma a conhecer a anatomia e histologia desse órgão, várias técnicas de coloração tem sido utilizadas, sendo a AgNOR estudada como marcadora de proliferação celular em tumores e empregada na avaliação da proliferação de células não tumorais (LINDNER, 1993; TRERÈ, 2000).

A capacidade de proliferação celular dos folículos de ratas foi estudada por Silva et al. (2003) pela técnica de AgNOR. A referida técnica de AgNOR, consiste em corar proteínas ligadas ao ácido ribonucléico ribossômico (RNAr) com a prata (Ag), a fim de obter um precipitado de grumos de nucléolo denominadas regiões organizadoras de nucléolos (NORs) (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989). Essas proteínas são sintetizadas durante a intérfase do ciclo celular e possuem

afinidade pela prata formando as NORs, que podem ser observadas e contadas ao microscópio óptico (MURRAY, 2004). A técnica avalia as NORs de cromossomos ativos e mostram a atividade proliferativa celular (CRESTA; ALVES, 2007).

A revisão a seguir tem o objetivo de explicar sobre a anatomia e histologia ovariana, bem como sobre a utilização da técnica de coloração AgNOR na proliferação celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia e Histologia do Ovário

Os órgãos genitais femininos responsáveis pelo crescimento e maturação dos oócitos são os ovários, os quais sintetizam estrógeno e progesterona, atuando como glândula endócrina (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ovário direito está em posição anatômica juntamente com a artéria ovariana direita e com o oviduto direito e o ligamento largo, o mesmo acontece para o lado esquerdo. Esse posicionamento pode ser verificado com as gônadas no útero bipartido por um septo que os separa de um corpo uterino proeminente, sendo as margens desse útero unidas à parede pélvica e abdominal pelo ligamento largo (SALI, 2010).

Na ovelha, os ovários têm forma de amêndoa com cerca de 1,5cm de comprimento e peso em torno de 3 a 4 gramas. São constituídos por epitélio superficial ou germinativo, que circunda a medula e a córtex (SISSON, 1986).

Tasende et al. (2002), no Uruguai, utilizando ovelhas da raça Corriedale no mês de setembro, obtiveram comprimentos ovarianos entre $10,2 \pm 0,6$ mm e $14,9 \pm 0,3$ mm e peso médio de $0,70 \pm 0,03$ g.

Logo abaixo do epitélio germinativo há um tecido conjuntivo fibroso e denso por cima de todo o ovário que é a túnica albugínea, com cerca de 100µm de espessura. O córtex ovariano possui os folículos e corpos lúteos em vários estádios de desenvolvimento sustentados por tecido conjuntivo e fibras musculares lisas em meio a vasos e nervos. A medula ovariana é formada de tecido conjuntivo fibroelástico, nervos extensivos e artérias, compreendendo a parte mais interna do ovário. As funções e duração do corpo lúteo (CL) parecem depender das modificações hemodinâmicas que ocorrem durante o ciclo estral (VENZKE, 1986).

Difundido por toda região do ovário está o estroma, formado por células semelhantes às embrionárias-mesenquimatosas que podem originar as células da teca interna ou as células intersticiais. O estroma cortical possui a maior quantidade de células musculares lisas que, junto com elementos nervosos, podem estar envolvidos no mecanismo de ovulação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A estrutura dos folículos em desenvolvimento é diferente para cada estádio, os folículos primordiais são aqueles formados durante a fase fetal cujo

ócito não possui zona pelúcida e é apenas envolvido pela pré-granulosa e pela membrana basal (MORAES, 2008). Os folículos primários possuem um oócito de aproximadamente 20µm de diâmetro envolto em uma camada de células foliculares achatadas ou cubóides (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Esses folículos primários estão presentes em maior quantidade na túnica albugínea ou logo abaixo do estroma ovariano da córtex. Folículos em crescimento possuem um maior número de camadas de células protegendo o oócito (*cumulus oophorus*), são maiores e apresentam zona pelúcida (MONTGOMERY et al., 2001).

Folículos pré-antrais com diâmetros entre 40 a 100µm foram descritos por Hemamalini et al. (2003) utilizando diferentes protocolos hormonais em folículos *in vitro*, obtendo os diâmetros máximos com uso de fator de crescimento epitelial (EGF).

Segundo Fortune (2003), folículos primordiais, primários e pré-antrais pequenos possuem entre 30 e 90µm. Os folículos pré-antrais médios possuem diâmetros entre 90 e 150 µm, os pré-antrais grandes entre 150 e 220 µm e os antrais pequenos entre 250 e 500µm.

Os folículos secundários desenvolvem-se mesmo em baixos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e possuem em torno de 0,1 a 2,5mm, possuem células foliculares cubóides da granulosa, núcleo esférico de cromatina difusa e nucléolo evidente e zona pelúcida (DUGGAVATHI et al., 2005). Revestindo a cavidade folicular está a membrana granulosa, que secreta o líquido folicular, o qual começa a ser produzido em folículos com diâmetro em torno de 0,2 a 0,4mm, com alto teor de estrogênio e que será armazenado no antro, embora não secretem volumes detectáveis de estradiol quando com diâmetro menor que 0,3mm (MORAES, 2008).

O líquido (liquor) folicular forma uma cavidade única, o antro e células foliculares circundam a zona pelúcida, formando a coroa radiata (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Com o aumento das células foliculares e com o antro repleto de liquor folicular, está formado o folículo maduro ou folículo de Graaf (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

Além da membrana granulosa, há a formação de uma membrana mais delgada formada pelas células da teca interna e externa, sendo a interna de rica vascularização e capaz de produzir estrógeno e progesterona e a externa formada por tecido conjuntivo frouxo (VENZKE, 1986).

O folículo pré-ovulatório é uma estrutura que, devido ao adelgaçamento da membrana granulosa, se projeta da superfície ovariana uma intumescência, como uma vesícula. O oócito está em fase de prófase da meiose e, quando ocorre a primeira divisão meiótica, há expulsão do primeiro corpúsculo polar (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Uribe-Velasquez, Oba, e Souza (2008), concluíram que os folículos alcançam o diâmetro máximo, em fêmeas ovinas não tratadas com progesterona, de 5,5mm de diâmetro.

Com o aumento nos níveis do LH e do volume de líquido do antro, há formação do estigma, uma protuberância cônica na superfície do folículo. O oócito é liberado dentro do antro circundado pelas células do *cumulus oophorum* e da corona radiata e após ruptura do estigma, há a ovulação e proliferação de células da teca interna e da granulosa para que seja formado o CL (VENZKE, 1986).

As células do CL são células da teca interna e da membrana granulosa hipertrofiadas e poliédricas. Com o aporte sanguíneo adequado, essas células são então denominadas células luteínicas pequenas e grandes. Possuem um redondo e volumoso núcleo central e o citoplasma é repleto de vacúolos de tamanhos variados, contendo colesterol e progesterona. Antes do estro, as células tem seu tamanho reduzido, o CL sofre luteólise, passando a ser chamado de corpus albicans (FITZ et al., 1982).

Ao longo do ciclo estral a estrutura microscópica do CL muda. A princípio, o CL é definido como um corpo hemorrágico, definido por uma estrutura cujos lóbulos são separados por um tecido conjuntivo e completo de vasos sanguíneos. As células do CL maduro possuem núcleo esférico e grande, o que indica atividade secretória. Corpos lúteos em regressão possuem espaços intersticiais grandes, núcleos pequenos e cromatina fragmentada, mostrando uma desorganização celular (MOURA et al., 2010).

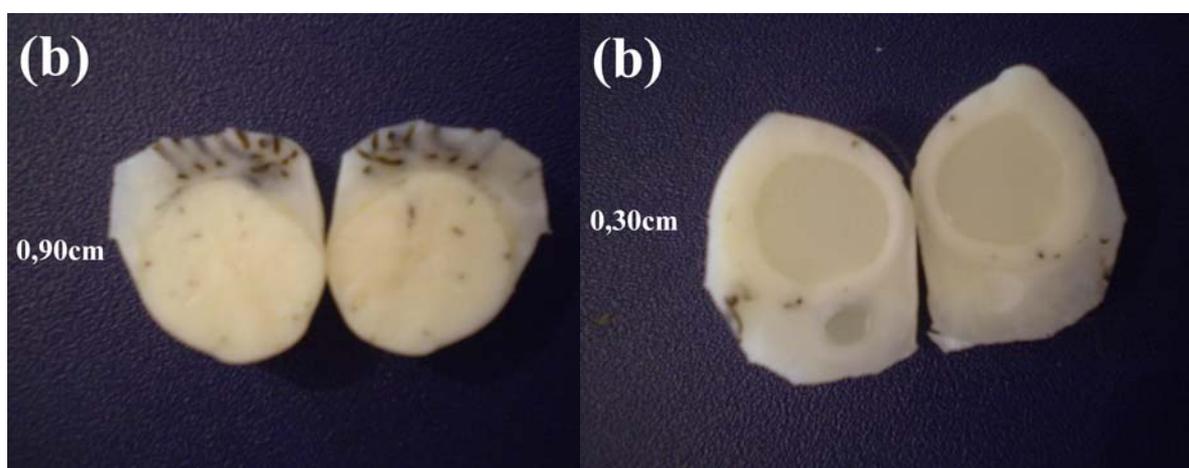
O tecido do CL, durante sua formação, pode proliferar ocupando apenas a área interior ou formando um ápice na superfície do ovário, sendo então denominado CL incluso e protruso (Fig. 1) respectivamente (NEVES et al., 2002).

Devido ao preenchimento incompleto da cavidade folicular pelas células no processo de luteinização, também podem existir CL com presença ou ausência de cavidade (CHACUR; OBA; KRONKA, 2009). Os CL quando apresentam

coloração amarela intensa são sugestivos de CL maduros baseando-se na classificação de Chacur et al. (2006).

Os CL em ovelhas podem ser classificados em quatro tipos: incluso e maciço, incluso e cavitário, protruso e maciço e protruso e cavitário (ARREBOLA et al., 2011), na Fig. 1 pode-se observar o CL maciço e incluso e o CL cavitário e protruso.

Figura 1 – Macroscopia do ovário de ovelha, onde se observa o Corpo Lúteo maciço e incluso (a), e cavitário e protruso (b)



Fonte: (ARREBOLA et al., 2011, p.269)

Após a regressão do CL, raramente serão encontradas células luteínicas, havendo predominantemente células do tecido conjuntivo fibroso, originando o corpo albicans (MOURA et al., 2010).

2.2 Estacionalidade e Ciclo Reprodutivo

De uma maneira geral, a espécie ovina, em especial as raças lanadas, apresentam estacionalidade reprodutiva nas altas latitudes, sendo os ciclos controlados por fatores relacionados à diminuição da luminosidade da estação. Por esse fator, possuem um período de anestro estacional ou inatividade ovariana e um período de atividade ovariana contínua ou cíclica que geralmente começam com o final do verão e terminam com o início da primavera (ROSA; BRYANT, 2003).

Sasa et al. (2002) na região localizada em 21°59'S, 47°26'O (Pirassununga, SP), relataram que fêmeas da raça Santa Inês (deslanadas) sofriam pouca influência do fotoperíodo, em contrapartida, fêmeas das raças Romney Marsh

e Suffolk (lanadas) tiveram anestro observado a partir de agosto. O mesmo resultado foi obtido em região geográfica próxima à anterior por Rodrigues et al. (2007), que concluíram que a localização interfere na resposta ao estímulo luminoso, visto que ovelhas Romney Marsh e Suffolk, originárias de altas latitudes, apresentaram máxima atividade reprodutiva durante o outono e o inverno.

Dados obtidos por Souza et al. (2008), com ovelhas mestiças (Suffolk x Ile de France) na latitude 22°53'S e longitude 46°29'O (Botucatu, SP), comprovaram atividade reprodutiva durante todo o ano.

Para a fêmea ovina entrar na puberdade, além de uma boa nutrição, da genética, dentre outros fatores, é preciso que ela atinja cerca de 8 meses de idade e que haja alterações no fotoperíodo (MONTEIRO; BICUDO; TOMA, 2010). Quando termina o solstício de verão (final do verão), o hipotálamo, em resposta à diminuição da sensibilidade ao feedback negativo dos estrógenos produzidos por folículos em crescimento, aumenta a síntese e liberação do GnRH, que vai orientar de forma pulsátil a secreção de LH e orienta também o crescimento do folículo (RODRIGUES et al., 2007). Os folículos em crescimento secretam estrógenos que levam à primeira onda pré-ovulatória de LH por um feedback positivo, que é responsável por produzir uma estrutura lútea que dura em torno de 3 a 4 dias. Após essa vida útil, ela morre e dá origem a uma nova onda de gonadotrofinas, que levam à ovulação e formação do CL. A partir desse momento, a progesterona vai ser o hormônio desencadeador do feedback negativo do LH (GONZÁLEZ, 2002).

Na ovelha adulta, o ciclo estral dura cerca de 17 dias (± 2 dias) e compreende uma série de eventos hormonais que acontecem em vários estádios, iniciando no proestro, estro, metaestro, diestro ou gestação (ocorridos com interrupção da luteólise) e anestro. A fase lútea dura em torno de 14 dias (ovulação até luteólise) e a fase folicular compreende o período após a luteólise até a ovulação. (URIBE-VELASQUEZ; OBA; SOUZA, 2008). Esse período pode durar até 26 dias dependendo da estação do ano para algumas raças (RODRIGUES et al., 2007).

Durante o anestro, há flutuações de concentrações plasmáticas de FSH e pulsos infrequêntes de LH que são responsáveis pelo crescimento folicular até que os folículos cheguem ao tamanho pré-ovulatório e entrem em atresia (GONZÁLEZ, 2002; URIBE-VELASQUEZ; OBA; SOUZA, 2008).

Os folículos em crescimento produzem estrógeno, o que exerce um feedback negativo provocando diminuição da frequência e aumentando a amplitude do pulso de LH, que não é capaz de promover ovulação e nem os sinais que a fêmea exterioriza de estro e os folículos sofrem atresia (CIARLINI, 2005; URIBE-VELASQUEZ; OBA; SOUZA, 2008).

Utilizando a ultrassonografia para avaliar a morfologia de folículos e relacionar com os níveis hormonais, Wu et al. (2009) observaram que grandes folículos antrais são responsáveis por secretar maior quantidade de estrógeno, sendo esse método de visualização útil para mostrar as mudanças na morfologia do folículo bem como sua função secretora.

O estímulo do fotoperíodo negativo é recebido pela retina e por meio do núcleo supraquiasmático e do gânglio cervical superior, é levado até a glândula pineal que produz a melatonina em resposta a pouca luminosidade (DAVIDSON; STABENFELDT, 2004). Esse hormônio, melatonina, vai atuar na regulação da atividade do hipotálamo promovendo uma alteração na sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário (o estrógeno passa a exercer feedback positivo e a progesterona é o hormônio que passa a ter efeito inibidor) modulando os pulsos de secreção do GnRH. O GnRH é o hormônio responsável pelo estímulo da liberação de LH e de FSH (GONZÁLEZ, 2002; LOUREIRO, 2003).

O proestro dura de 2 a 3 dias, sendo caracterizado pelo crescimento folicular e secreção de estrógeno. Com a aproximação do estro, a vulva incha, o vestíbulo torna-se hiperêmico e as glândulas da cérvix e vagina produzem secreção serosa (descarga vaginal) (JAINUDEEN; WAHID; HAFEZ, 2004).

Aproximadamente um dia antes do estro, sob influência do FSH, um ou mais folículos crescem de forma rápida aumentando os níveis de estrógeno que estimulam a produção de LH. São necessárias cerca de 3 a 4 ondas foliculares para que tenha ovulação e a primeira ovulação desse período não vem acompanhada dos sinais de estro, formando um CL com pouco tempo de duração (DRIANCOURT, 2001).

Quando é determinada a dominância folicular, há a expressão de receptores de LH na camada de células da granulosa. Esse folículo dominante, ou ovulatório, produz estrógeno que vai exercer um feedback positivo na hipófise para aumentar a produção de LH com padrão pulsátil de alta frequência e então, cerca de

14 horas após o pico de LH, ou 25 a 30 horas após o início do estro, há a ovulação e formação do CL (NEVES et al., 2008; GONZÁLEZ, 2002).

O aumento dos níveis de progesterona durante a fase luteal promove o feedback negativo para secreção de LH, diminuindo a frequência de secreção e inibindo o desenvolvimento dos folículos até que ocorra a luteólise (GONZÁLEZ, 2002; SOUZA et al., 2002).

Em ovelhas que não são gestantes, a atividade do CL dura em torno de 14 dias devido à produção de prostaglandina F2 alfa (PGF2-alfa) pelo útero, o que leva a um novo estro (RUBIANES; MENCHACA; CARBAJAL, 2003). Na ovelha gestante os pulsos de PGF2-alfa não existem devido à ação de reconhecimento do blastocisto pelo endométrio, pois a vida útil do CL precisa ser mais prolongada, e a duração da gestação da ovelha dura cerca de 147 dias (STABENFELDT; EDQVIST, 1996; NEVES et al., 2008).

2.3 Fatores Promotores de Crescimento

Os fatores de crescimento são importantes para promover a atividade mitogênica na proliferação e remodelamento de um tecido alvo. São fatores intra-ovarianos formados por polipeptídeos semelhantes a hormônios com capacidade de estimular a multiplicação de células (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSNINA, 2004).

As células da teca são estimuladas para diferenciação e proliferação celular por vários fatores, dentre eles o LH, induzindo a luteinização/diferenciação das células da teca; e IGF (fator de crescimento semelhante à insulina): induzindo à proliferação celular (YOUNG; MCNEILLY, 2010).

Em folículos antrais, o IGF estimula a proliferação, atividade e diferenciação das células da granulosa e a esteroidogênese (SILVA; FIGUEIREDO; HURK, 2009). As proteínas morfogenéticas dos ossos (BMP) também são fatores que atuam na regulação da esteroidogênese (YOUNG; MCNEILLY, 2010).

O IGF e os fatores de crescimento de transformação beta (TGF-beta), como a ativina, são responsáveis por estimular a aromatização dos andrógenos por parte das células da granulosa, pois potencializam a ação do FSH. Isso promove uma maior liberação de estrógeno para o antro (GONZALEZ-BULNES et al., 2004).

Os responsáveis por aumentar a ação do LH para produção dos andrógenos (precursores do estrógeno) são o IGF e a inibina (LEYVA; BUCKRELL;

WALTON, 1998). Durante o ciclo estral, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) regula o desenvolvimento do CL (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSNINA, 2004; YOUNG; MCNEILLY, 2010).

2.4 Técnica de Coloração AgNOR

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são alças de ácido desoxirribonucléico (DNA) responsáveis por sintetizar ácido ribonucléico ribossomal (RNAr) durante a intérfase, período de síntese protéica e de aumento de volume, tamanho e número de organelas da célula (VANDELAER; THIRY; GOESSENS, 1999; MILLER et al., 2002).

O ciclo celular compreende as fases de meiose, interfase e mitose. A duplicação do cromossomo ocorre especificamente na fase de interfase, sendo essa dividida em 3 partes: fase G1 (intensa produção de proteínas e RNA), fase S (síntese do DNA) e fase G2 (período de duplicação de centríolo). As células que param de se replicar encontram-se em fase G0, que acontece imediatamente antes do início da síntese de DNA (MURRAY, 2004). É no nucléolo, localizado no núcleo celular, que há armazenamento e produção de RNAr, que ligados à várias proteínas irão formar os ribossomos (LEE et al., 1999).

Proteínas não histonas possuem sítio de ligação com RNAr (AgNOR) e tem afinidade pela prata e com isso, elas precipitam formando grumos de nucléolo, isolados ou agrupados, que podem ser observados à microscopia óptica (CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989). As proteínas mais conhecidas e também as mais presentes (60-75%) em células em proliferação são a C23 (nucleolina) e a B23 (nutramina) (SIRRI; ROUSSEL; HERNANDEZ-VERDUM, 2000).

A técnica AgNOR avalia as NORs de cromossomos ativos durante o ciclo celular e o número ou área das NORs mostram essa atividade proliferativa, a partir da fase G1 até o máximo na fase S do ciclo (MURRAY, 2004; CRESTA; ALVES, 2007).

Células no período de síntese protéica e de aumento de volume estão em atividade independente de existência de proliferação celular, ou seja, células ativas, mas não em mitose, possuem pontos de NORs (UNDERWOOD, 1995)

As proteínas que são coradas pela prata aparecem ao microscópio como pontos pretos dentro dos nucléolos, que podem ser contados de acordo com o

número de pontos por célula diretamente ao microscópio ou avaliados quanto a morfometria em analisador de imagem, sendo esse último um método mais rápido e preciso. A capacidade de corar os NORs pela prata é influenciada por vários fatores, como métodos de fixação e duração da exposição a diferentes temperaturas (TRERÈ, 2000).

Smith et al. (1988), avaliando várias técnicas de fixadores, chegaram à conclusão de que o fixador alcoólico foi o que gerou melhor marcação AgNOR.

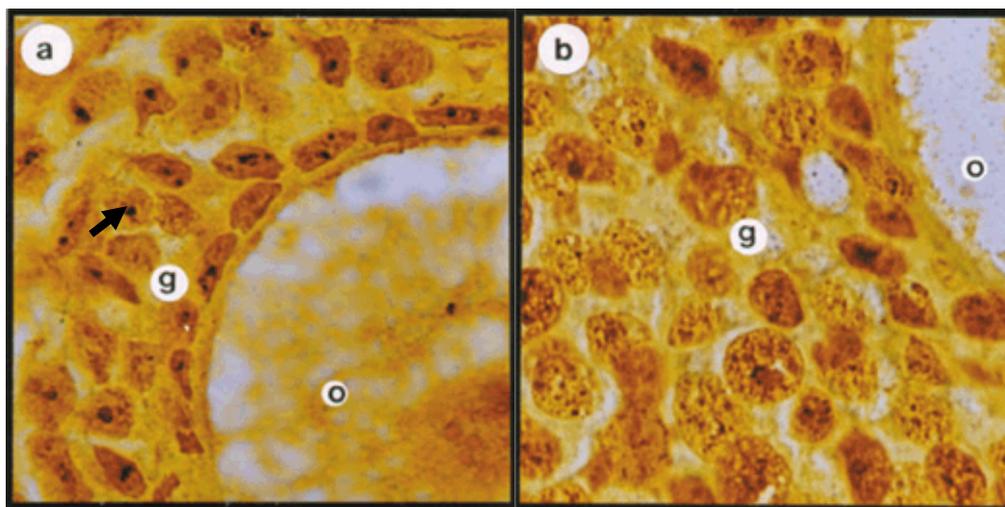
Os tecidos possuem uma alta sensibilidade à oxidação. Em um estudo sobre melhores técnicas para coloração AgNOR, Lindner (1993) verificou essa sensibilidade e chegou à conclusão de que os fixadores alcoólicos e o formaldeído permanecem os de escolha para a técnica, mantendo as lâminas coradas com esse procedimento por mais de seis meses sem sinais de deterioração.

Serakides et al. (1999), corando células da tireóide de bovinos verificou que a técnica AgNOR foi eficiente para diferenciar os diferentes graus de hiperplasia da tireóide, observando um grande número e pequeno tamanho de NORs marcados devido à proliferação das células.

Esse modelo de marcação AgNOR possui um grande valor para diagnóstico e prognóstico de tumores, pois quanto maior o grau de malignidade, maior o número e menor o tamanho de AgNORs presentes dentro do núcleo (EGAN; CROCKER, 1988; CROCKER; BOLDY; EGAN, 1989).

Dados de Silva et al. (2003) com ratas, embora não tenham trabalhado com folículos terciários, mostraram que os folículos com duas a três camadas celulares possuíam poucas e grandes NORs e os folículos com mais de 5 camadas de células possuíam muitos e pequenos pontos ao contar as NORs de células da granulosa de folículos secundários sem a formação do antro (Fig. 2).

FIGURA 2 – Folículo secundário de três camadas de células da granulosa apresentando regiões organizadoras de nucléolo argentafins (AgNORs) grandes e em pequeno número, 1607X (a), Folículo secundário de mais de cinco camadas de células da granulosa apresentando AgNORs pequenas, em grande número e dispersas por todo núcleo, 1607X (b). g = granulosa; o = oócito



Fonte: (SILVA et al., 2003, p. 4).

Com essas observações, pode-se justificar o uso da técnica de coloração AgNOR para avaliar proliferação celular em células foliculares saudáveis e não apenas em processos tumorais como mostrou Pich, Chiusa e Margaria (2000), em revisão de literatura sobre aparelho reprodutor e respiratório de humanos, onde relata que quanto maior o número de NORs, maior a atividade proliferativa das células.

Santos, Guedes e Cassali (1998) obtiveram como resultado que quanto maior a taxa de proliferação celular, maior o número de pequenas NORs, assim como Hastie e Haresign (2010).

As NORs podem ser distribuídas no núcleo e nucléolo de maneira isolada e difusa, preenchendo todo o nucléolo, agrupadas em cordões, dispostas em satélites ou agrupadas em colares quando utiliza-se o analisador de imagens, mas, apesar de ser um método mais prático de contagem, o método de contagem visual ainda possui resultados com menores probabilidades de erro (SANTOS; GUEDES; CASSALI, 1998).

REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - Anualpec. São Paulo: AgraFNP, 2010. p.273.
- ARREBOLA, T. A. H. et al. Morfologia de corpos lúteos de ovelhas da raça Santa Inês coletadas em matadouro. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 19., 2011, Recife. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2011. v. 19. p. 269-269.
- CIARLINI, L. D. R. P.; MUNIZ, L. M. R.; CIARLINI, P. C. Níveis séricos de estradiol em ovelhas das raças Suffolk e Ideal no final da gestação, durante a lactação e após o desmame. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 11, n. 1, p. 69-73, 2005.
- CHACUR, M.G.M.; OBA, E.; KRONKA, S.N. Correlações entre morfometria ovariana e hormônios em vacas zebus não prenhes. **Arch. Zootec.**, v. 58, p. 1-4, 2009.
- CHACUR, M.G.M. et al. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. **Acta Sci. Vet.**, v. 34, n. 1, p. 65-70, 2006.
- CRESTA, F. B.; ALVES, M. R. Avaliação da cinética do epitélio corneano com marcadores de proliferação celular. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 70, n. 6, p. 953-960, 2007.
- CROCKER, J.; BOLDY, D. A. R.; EGAN, M. J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **Journal of Pathology**, v. 158, p. 185-188, 1989.
- DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. Controle da ovulação e do corpo lúteo. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 393-407.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- DUGGAVATHI, R. et al. The temporal relationship between patterns of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late-luteal phase of sheep. **Theriogenology**, v. 64, p. 393-407, 2005.
- EGAN, M. J.; CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors. **Journal of Pathology**. v. 154, p. 247-253, 1988.
- FITZ, T. A. et al. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, n. 27, p. 703-711, 1982.
- 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.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/endocrino/endocrinolvet.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2009.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1, p. 107-119, 2004.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Feminina. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 13-30.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 33-54.

HASTIE, P.M. e HARESIGN, W. Modulating peripheral gonadotrophin levels affects follicular expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor binding proteins in sheep. **An. Rep. Sci.**, v.119, n.3, p.198-204, 2010.

HEMAMALINI, N. C. et al. Influence of transforming growth factor- α , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of pre antral follicles in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 50, p. 11-22, 2003.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Ovinos e Caprinos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p. 173-182.

LEE, W. et al. AgNOR of Human Interphase Cells in Relation to Acrocentric Chromosomes. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 113, p. 13-18, 1999.

LEYVA, V.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology**, v. 50, n. 3; p. 395-416, 1998.

LINDNER, L. E. Improvements in the Silver-staining Technique for Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 439-445, 1993.

LOUREIRO, M. F. P. **Indução do estro por implante de melatonina em ovinos da raça Suffolk**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MILLER, M. L. et al. Insight into UV-induced ultrastructure, trichrome stain and spectral imaging. **Mícron.**, v. 33, p. 157-166, 2002.

MONTGOMERY, G. W. et al. Genes controlling ovulation rate in sheep. **Reproduction**, v. 121, p. 843-852, 2001.

- MORAES, J. C. F. et al. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. In: GONÇALVEZ, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 33-56.
- MONTEIRO, C. D.; BICUDO, S. D.; TOMA, H. S. Puberdade em fêmeas ovinas. **PUBVET, Londrina**, v. 4, n. 21, ed. 126, Art. 856, 2010. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=738>. Acesso em: 27 set. 2011.
- MOURA, M. T. M. M. de et al. Morphological features and vascularization study of caprine cyclic corpus luteum. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 4, p. 351-357, 2010.
- MURRAY, A. W. Recycling the cell cycle: cyclings revisited. **Cell.**, v. 116, p. 221-234, jan. 2004.
- NEVES, M. M. et al. Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, n.6, p. 651-654, 2002.
- NEVES, J. P. et al. Diagnóstico de prenhez em ruminantes. In: GONÇALVEZ, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 17-32.
- PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNORS in tumor pathology. **Micron.**, v. 31, p. 133-141, 2000.
- RODRIGUES, P. de A. et al. Annual characteristics of estrous activity in wool and hair ewe lambs under subtropical conditions. **Sci. Agric.**, v. 64, n. 5, p. 468-475, 2007.
- ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Rum. Res.**, v. 48, p. 155-171, 2003.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F₂α. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 47-55, 2003.
- SALI, K. M. Determination of anatomical location to the parts of female genital system of awassi ewes by using laparoscopy. **J. Vet. Anat.**, v. 3, n. 2, p. 47-54, 2010.
- SANTOS, F. G. A.; GUEDES, R. M. C.; CASSALI, G. D. Caracterização e quantificação de regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs) em tumor venéreo transmissível canino, genital e extragenital. **Arq. Brás. Med. Vet. Zootec.**, v. 50, n. 6, p. 665-672, 1998.
- SASA, A. et al. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro, no Estado de São Paulo. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1150-1156, jun. 2002.

SERAKIDES, R. et al. Histomorphometry and Quantification of Nucleolar Organizer Regions in Bovine Thyroid Containing Methylthiouracil Residues. **Vet. Pathol.**, v. 36, p. 574-582, 1999.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; HURK, R. van den. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, p. 1193-1208, 2009.

SILVA, C. M. et al. Quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetro para avaliar a proliferação das células da granulosa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p.113-116, fev. 2003.

SIMPLICIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 5, Supl., p. 17-27, 2002.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUM, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron.**, v. 31, p. 121-126, 2000.

SISSON, S. Aparelho Urogenital do Ruminante. In: SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.1: p. 879-895.

SMITH, P. J. et al. The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. **Journal of Pathology**, v. 155, p. 109-112, 1988.

SOUZA, M. I. L. et al. Secreção de esteróides ovarianos, em ovelhas mestiças de raças exploradas para corte, em distintos momentos reprodutivos, no estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1107-1113, out./dez. 2008.

SOUZA, M. I. L. et al. Secreção diária de estradiol, progesterona e hormônio folículo estimulante (FSH) em ovelhas durante o anestro estacional. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, Umuarama, v. 5, n. 1, p. 15-20, jan./jun. 2002.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Processos reprodutivos na fêmea. In: DUKES, H. H. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 615-644.

TASENDE, C. et al. Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anestrous ewes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1719-1731, 2002.

TRALDI, A. de S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: FEINCO - FEIRA INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 3., 2006. São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 2006.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron.**, v. 31, p. 127-131, 2000.

UNDERWOOD, J. C. AgNOR measurements as indices of proliferation, ploidy and

prognosis. **J. Clin. Pathol.**, v. 48, n. 5, p. 239-240, 1995.

URIBE-VELASQUEZ, L.F.; OBA, E.; SOUZA, M. I. L. Efeitos da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 58-65, fev. 2008.

VANDELAER, M.; THIRY, M.; GOESSENS, G. AgNOR proteins from morphologically intact isolated nucleoli. **Life Sciences**, v. 64, n. 22, p. 2039-2047, 1999.

VENZKE, W. G. Endocrinologia Geral. In: SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.1, p. 140-152.

WU, D. et al. Relationships of changes in ultrasonographic image attributes to ovulatory and steroidogenic capacity of large antral follicles in sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, 2009, v. 116, n. 1/2, p. 73-84.

YOUNG, M. J.; MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v. 140, n. 4, p. 489-504, 2010.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Caracterização da proliferação celular de estruturas ovarianas de ovelhas pela técnica de AgNOR: morfometria ovariana e correlações

[*Characterization and celular proliferation of ovarian structures of ewes by the technique of AgNOR: ovarian morfometry and correlations*]

T.A.H. Arrebola¹, D.B. Ibrahim¹, M.G.M. Chacur^{2*}, O.C. Sanches³, L.R.A. Gabriel Filho⁴

¹Discentes do Mestrado em Ciência Animal - UNOESTE - Presidente Prudente, SP.

²Laboratório de Reprodução Animal - (UNOESTE – Campus II), Rod. Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro, CEP19067-175, Presidente Prudente-SP/Brasil.

Fone:(18)32292077, Fax:(18)32292036 .

E-mail: chacur@unoeste.br, taharrebola@yahoo.com.br.

³Laboratório de Patologia Veterinária - UNOESTE - Presidente Prudente, SP. ⁴Universidade Estadual Paulista - UNESP - Tupã, SP.

RESUMO

A técnica de coloração AgNOR para regiões organizadoras de nucléolos (NORs) é caracterizada por marcar proteínas ligadas ao ácido ribonucléico ribossômico, avaliando a proliferação celular. O objetivo do trabalho foi estudar a morfometria ovariana e a validade da técnica AgNOR na proliferação de células saudáveis das estruturas ovarianas em ovelhas mestiças. Foram colhidos 102 pares de ovários e mensurou-se o diâmetro do maior folículo de cada ovário. Do maior corpo lúteo (CL), o diâmetro e a largura foram mensurados, classificando-os em: incluso, protruso, maciço e cavitário, seguidos por coloração AgNOR. O nível de significância foi de 5% (*R Statistical System*). Houve diferença ($P < 0,05$) para o diâmetro do maior folículo entre os lados direito (OD): $4,2 \pm 2,3$ mm e esquerdo (OE): $3,6 \pm 2,2$ mm. Houve correlação ($P < 0,01$) entre as NORs da teca interna (TI) e externa (TE): OD (0,46) e OE (0,61); NORs da granulosa e TI: OD (0,54) e OE (0,59); e entre NORs da granulosa e TE: OD (0,34) e OE (0,38). Conclui-se que a quantificação das NORs foi

apropriada para o estudo da determinação do potencial de proliferação das estruturas ovarianas, a qual foi similar para os lados direito e esquerdo.

Palavras-chave: *Ovis aries*, anatomia ovariana, proliferação celular, proteína argirofílica

ABSTRACT

The AgNOR staining technique for nucleolar organizer regions (NORs) is characterized by marking proteins related to ribosomal ribonucleic acid evaluating cellular proliferation. The objective was to study the ovarian morphometry and the value of AgNOR technique application to evaluate the proliferation of healthy cells from ovarian structures in crossbred ewe. 102 pairs of ovaries were collected and from the largest follicle of each ovary was measured its diameter. From the largest corpus luteum (CL) was measured the diameter and width, classifying the CL in: included, protruberant, massive and cavity, followed by AgNOR staining. The significance level was 5% (R Statistical System). It had difference ($P < 0,05$) for the diameter of the largest follicle between right (RO): $4,2 \pm 2,3$ mm and left (LO): $3,6 \pm 2,2$ mm sides. There was a correlation ($P < 0,01$) between the NORs of internal theca (IT) and external theca (ET): RO (0,46) and LO (0,61); NORs of granulosa and IT: RO (0,54) and LO (0,59); and NORs of granulosa and ET: RO (0,34) and LO (0,38). We conclude that the NORs quantification was appropriate to study the determination of the potential for ovarian structures proliferation, which was similar for right and left sides.

Keywords: Ovis aries, ovarian anatomy, cellular proliferation, argyrophilic protein

INTRODUÇÃO

Segundo o Anuário da Pecuária Brasileira de 2010, no ano de 2008 havia um rebanho de 453.261 mil cabeças de ovinos no estado de São Paulo dentro de 16.628.571 milhões no Brasil, em comparação com o ano de 2000, com 233.681 mil no estado paulista e de 14.784.958 milhões no país, mostrando uma crescente expansão com cerca de 52% no período de oito anos.

Segundo Traldi (2006), essa expansão promove a busca de otimização de técnicas para a manipulação do ciclo estral e para a utilização das biotécnicas, sendo necessário conhecer, além da endocrinologia da reprodução, a anatomia e histologia dos ovários.

O estudo aplicado da morfometria ovariana está diretamente ligado à interpretação do ciclo estral e para uso de biotécnicas da reprodução na ovinocultura, que atualmente ocupa um lugar de importância nos criatórios de interesse zootécnico (Simplicio et al., 2002).

Os órgãos genitais femininos responsáveis pelo crescimento e maturação dos oócitos são os ovários. Na ovelha, as gônadas têm forma de amêndoa com cerca de 1,5cm de comprimento e peso em torno de 3 a 4 g (Sisson, 1986), são constituídos de epitélio germinativo escamoso ou cubóide simples que circunda a córtex (Hafez e Hafez, 2004).

A estrutura e proliferação celular dos folículos em desenvolvimento, presentes na córtex, é diferente para cada estágio e podem variar em tamanho de 40µm a 5,5mm de diâmetro (Hemamalini et al., 2003; Uribe-Velasquez et al., 2008).

As células do corpo lúteo (CL) se originam das células da teca interna e da membrana granulosa com hipertrofia e hiperplasia, sendo denominadas células luteínicas pequenas e grandes, respectivamente (Fitz et al., 1982).

A capacidade de proliferação celular dos folículos de ratas foi estudada por Silva et al. (2003) pela técnica de AgNOR, sendo essa mesma coloração empregada na avaliação da proliferação celular em tumores (Lindner, 1993; Trerè, 2000). A referida técnica de AgNOR, consiste em corar proteínas ligadas ao ácido ribonucléico ribossômico (RNAr) com a prata (Ag), a fim de obter um precipitado de grumos de nucléolo denominadas regiões organizadoras de nucléolos (NORs) (Crocker et al., 1989). Essas proteínas são sintetizadas durante a interfase do ciclo celular e possuem afinidade pela prata formando as NORs, que podem ser observadas e contadas ao microscópio óptico (Murray, 2004). A técnica avalia as NORs de cromossomos ativos e mostram a atividade proliferativa celular (Cresta e Alves, 2007).

Vale salientar que perante a escassez de informações colhida na revisão de literatura, relacionada ao emprego da técnica de AgNOR com finalidade de estudar a proliferação celular das estruturas ovarianas saudáveis nas espécies animais, dentre elas a ovina, objetivou-se estudar a morfometria ovariana e a validade do uso da técnica de AgNOR na proliferação de células saudáveis das estruturas ovarianas em ovelhas mestiças.

MATERIAL E MÉTODOS

Ovários de ovelhas foram coletados em abatedouro pertencente ao município de Promissão-SP (altitude: 426m, latitude: 21°32'12"S, longitude: 49°51'29"O), imediatamente após o abate e evisceração dos animais. Ao todo coletou-se 102 pares de ovários pertencentes

à ovelhas mestiças (lanadas x deslanadas), entre 6 e 12 meses de idade, não prenhes, nos meses de março a maio (final do verão/outono) de 2010.

As gônadas foram identificadas em ovário direito (OD) e ovário esquerdo (OE) em sacos individuais para cada par de ovários, armazenados e transportados em solução salina a 37°C, durante 3 horas, para os laboratórios de Reprodução Animal e de Patologia Veterinária da UNOESTE. Realizou-se a análise morfométrica com o auxílio de um paquímetro, de modo a verificar o comprimento (mm) no eixo maior; a largura (mm), no eixo entre o pedículo do ovário e a extremidade oposta; e a altura (mm), no eixo de 90° em relação à largura.

Com a imersão dos ovários em proveta graduada contendo solução fisiológica o volume (mL) das gônadas foi obtido e com o auxílio de uma balança digital aferiu-se o peso (g) dos ovários.

A classificação dos folículos avaliados foi realizada de acordo com Figueiredo et al., (2008), na qual folículos terciários possuem diâmetro igual ou superior a 119µm.

Os dois maiores folículos de cada ovário foram identificados macroscopicamente, antes do corte longitudinal, e mensurados quanto ao seu diâmetro (mm). Após o corte longitudinal, o corpo lúteo (CL) foi avaliado quanto ao diâmetro (mm) e largura (mm), sendo a área definida pelo cálculo a partir da área da elipse, determinada pela relação $\text{Área} = \pi \cdot D \cdot L / 4$, onde: D representa o diâmetro e L a largura do CL. Os CL também foram classificados de acordo com os tipos em: incluso, protruso, maciço e cavitário, conforme Chacur et al. (2006).

Técnica para coloração de AgNOR conforme proposto por Sanches (2010), adaptado de Ploton et al. (1986): Utilizando a solução de Davidson (Fixador de Davidson A.F.A.: 20mL de formol, 30mL de álcool 95%, 10mL de ácido acético, 30mL de água destilada), fixou-se as pequenas amostras do tecido ovariano de ovelhas (ovário com corte longitudinal), com aproximadamente 0,5mm de largura, por 24 a 48 horas. Após esse período, elas foram lavadas em água corrente durante 1 hora e transferidos para uma solução de álcool 70% e, então, desidratadas em série alcoólica crescente (álcool 80%, 96% e 100%), permanecendo 40 minutos à frio em cada "álcool". Foi realizada a diafanização (ou clareamento) utilizando 4 fases de 40 minutos, sendo a primeira no álcool + xilol (1:1) e as outras 3 de xilol. Foi realizada inclusão em parafina inserindo a amostra de tecido na parafina com ponto de fusão em 56°C-60°C por duas vezes para posterior inclusão em parafina e montagem dos blocos. As amostras em parafina foram cortadas em blocos de 5 µm de espessura, utilizando o micrótomo rotativo (Micrótomo Cortador de Bloco, mod. 820, American Optical N-45387, USA). Posteriormente, foram desparafinizadas em xilol por 5 minutos (por três vezes),

hidratadas passando lentamente em álcool absoluto (100%) por três vezes e lavadas com água de torneira por 5 minutos. Os cortes, em lâmina, ficaram incubados ao abrigo de luz em câmara úmida durante 40 minutos a 60°C numa solução contendo nitrato de prata, obtida utilizando-se 1g de gelatina incolor, 0,5mL de ácido fórmico e 50mL de água deionizada (solução A) e 12,5 gramas de nitrato de prata e 25mL de água deionizada (solução B), sendo uma parte de solução A para duas partes de solução B.

As amostras foram retiradas da solução corante quando apresentaram coloração marrom-escura e lavadas em água deionizada morna a 45°C para poder retirar o precipitado formado pela gelatina. Após esse procedimento, as lâminas passaram em solução de tiosulfato de sódio a 5% durante 5 minutos de modo a retirar toda prata reduzida depositada sobre as células. As amostras foram desidratadas (álcool 96% e 100% - 3 vezes, lentamente; xilol - 3 vezes lentamente), colocadas em Van Gieson (ou "verde luz") por 3 minutos, para a finalização da montagem das lâminas com lamínula e resina sintética (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

A contagem das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) foi realizada observando grumos de nucléolos, que puderam ser contados de acordo com o número de pontos no núcleo de cada tipo celular presente no ovário, sendo elas: o folículo (teca externa, teca interna e granulosa); o CL; e o corpo albicans, por meio de microscopia óptica na magnitude de (1000x).

O padrão de contagem das NORs foi realizado considerando-se 10 células/campo de cada tipo celular, repetindo-se em 10 campos microscópicos, totalizando a contagem em 100 células de cada um dos tipos celulares, conforme Sanches (2010) adaptado de Löhr et al. (1997).

A análise dos dados da morfometria ovariana foi obtida a partir dos resultados das médias, que foram submetidos, para os grupos com distribuição normal, à análise de variância pelo teste F (Cremasco et al., 2009) para observações pareadas, conforme delineamento inteiramente casualizado.

Modelo matemático:

$$x_{ij} = m + t_i + e_{ij},$$

em que: x_{ij} = valor observado na parcela do lado i e repetição j ; m = média geral; t_i = efeito do lado i ; e_{ij} = efeito do acaso.

Para os grupos com distribuição não normal, foi realizada a análise de variância utilizando o teste de Friedman. Em todos os testes, o nível de significância considerado foi de

5 %, sendo utilizado o programa computacional *R Statistical System* (Ihaka e Gentleman, 1996) para a realização das análises estatísticas.

Para alguns pares de medições de interesse foi calculado o coeficiente de correlação linear por meio do teste t de Student. Para o número de CL foi aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2).

Foi utilizada a correlação de Spearman em virtude dos *ranks* de classificação dos dados para a Técnica de coloração AgNor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em localização geográfica próxima à do presente estudo desenvolvido com as ovelhas mestiças, Sasa et al. (2001) na região localizada em 21°59'S, 47°26'O (Pirassununga, SP), relataram que fêmeas da raça Santa Inês (deslanadas) sofriam pouca influência do fotoperíodo, em contrapartida, fêmeas das raças Romney Marsh e Suffolk (lanadas) tiveram anestro observado a partir de agosto. O mesmo resultado foi obtido em região geográfica próxima à anterior por Rodrigues et al. (2007), que concluíram que a localização interfere na resposta ao estímulo luminoso, visto que ovelhas Romney Marsh e Suffolk, originárias de altas latitudes, apresentaram máxima atividade reprodutiva durante o outono e o inverno.

Dados obtidos por Sousa et al. (2008), com ovelhas mestiças (Suffolk x Ile de France) na latitude 22°53'S e longitude 46°29'O (Botucatu, SP), comprovaram atividade reprodutiva durante todo o ano.

O volume do ovário direito (OD) revelou um coeficiente de variação (CV) de 55% e o volume do ovário esquerdo (OE), de 56%. O peso ovariano revelou CV entre 54% e 57%, sendo esses valores superiores aos obtidos para o CV do comprimento, largura e altura, respectivamente de 19%, 26% e 25% para OD, e de 20%, 31% e 27% para OE (Tab. 1).

Para a morfometria ovariana, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) conforme a Tab.1, sendo os resultados de 12,7±2,5mm (OD) e 12,4±2,5mm (OE) de comprimento; e 0,87±0,47g (OD) e 0,79±0,45g (OE), semelhantes aos valores obtidos por Tasende et al. (2002), no Uruguai na raça Corriedale no mês de setembro, com comprimentos ovarianos entre 10,2±0,6mm e 14,9±0,3mm e peso dos ovários de 0,70±0,03g. Vale salientar que as ovelhas Corriedale estavam em anestro (mês de setembro) e, provavelmente, o comprimento e o peso dos ovários sofreram a influência do mês em questão. Por isso, a semelhança entre esses dois parâmetros no presente estudo com ovelhas mestiças (lanadas x deslanadas) com atividade cíclica ovariana.

Pesos esses inferiores aos valores encontrados na literatura que variavam de 3 a 4g (Sisson, 1986), podendo estar relacionado à genética dos animais avaliados.

Tabela 1. Médias e resultados da análise de variância do comprimento, largura, altura, peso e volume de 102 pares de ovários de ovelhas mestiças coletados em matadouro.

	Ovários									
	Comprimento(mm)		Largura (mm)		Altura (mm)		Peso (g)		Volume (mL)	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
Média	12,7	12,4	9,2	8,8	10,7	10,3	0,87	0,79	0,85	0,78
Desvio	2,5	2,5	2,3	2,7	2,6	2,8	0,47	0,45	0,46	0,44
C.V. (%)	19	20	26	31	25	27	54	57	55	56
P valor	0,919 ^{NS}		0,302 ^{NS}		0,206 ^{NS}		0,225 ^{NS}		0,473 ^{NS}	

*significativo a 5%; ^{NS} não significativo; OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo.

Quanto às estruturas ovarianas, os folículos mensurados foram apenas os dois que apresentaram maior diâmetro em cada ovário. Para o maior folículo houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o lado direito ($4,2 \pm 2,3$ mm) e esquerdo ($3,6 \pm 2,2$ mm) e para o segundo maior folículo obteve-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os lados direito e esquerdo, sendo $2,3 \pm 0,9$ mm e $1,5 \pm 1,1$ mm respectivamente (Tab.2). Valores esses inferiores ao relatado por Uribe-Velasquez et al. (2008) com média de 5,5mm na raça Bergamácia. Diferença essa que pode estar relacionada com a distinta origem genética dos animais.

Tabela 2. Médias e resultados da análise de variância das estruturas ovarianas (folículo e CL) de 102 pares de ovários de ovelhas mestiças coletados em matadouro.

	Ovários							
	>Fol. (mm)		2º>Fol. (mm)		Diâmetro CL (mm)		Largura CL (mm)	
	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
Média	4,2	3,6	2,3	1,5	6,6	5,7	6,9	5,4
Desvio	2,3	2,2	0,9	1,1	2,9	3,1	3,2	2,9
C.V.(%)	54	61	42	73	45	55	47	53
P valor	0,024*		<0,001*		0,175 ^{NS}		0,071 ^{NS}	

*significativo a 5%; ^{NS} não significativo; OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo; >Fol.: diâmetro do maior folículo; 2º>Fol.: diâmetro do segundo maior folículo.

Observou-se que do total de 204 ovários, 42,65% (87) possuíam CL e desses, 50,57% (44) estavam presentes no lado direito e 49,43% (43) no lado esquerdo. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os lados direito e esquerdo para o número de CL, semelhante aos relatos de Casida et al. (1966) com dados de 55,5% de CL no OD.

Em relação aos CL presentes nos ovários direito e esquerdo, corrobora com Moakhar et al. (2010), que demonstram homogeneidade na atividade ovariana luteal cíclica.

Com relação à morfologia dos CL, houve predominância de estrutura do tipo maciço (75,86%) e incluso (59,77%) sobre os tipos cavitário (24,14%) e protruso (40,23%) nos 87 ovários com presença da estrutura. Para a espécie ovina, conforme a literatura consultada, não há informações referentes à classificação dos CL. Para fins de comparação, adotamos a espécie bovina, conforme abaixo descrito.

Vale destacar que os CL classificados nas ovelhas do presente estudo apresentavam coloração amarela intenso, sugestiva de CL maduros baseando-se na classificação de Chacur et al (2006). A porcentagem de CL cavitários foi semelhante ao encontrado por Chacur et al. (2006), em fêmeas zebus *Bos taurus indicus* de 26,41% CL cavitários do total de CL; e diferente na quantidade de CL inclusos com 26,20% do total de ovários com a presença da estrutura.

No presente trabalho, o padrão de NORs foi de pequenas e numerosas NORs distribuídas no núcleo nos tipos celulares do folículo e de grandes NORs ao centro do núcleo das células do CL e pequenas próximas à carioteca.

As fotomicrografias relativas ao CL e corpo albicans mostram as regiões organizadoras de nucléolos (NORs; Fig.1).

LOCAL PARA INSERIR A FIGURA 1.

Para a correlação entre as médias das NORs nas estruturas ovarianas para os lados direito e esquerdo, não houve diferença significativa ($P>0,05$; Tab. 3).

Tabela 3. Correlações entre OD e OE para o número médio de NORs de estruturas ovarianas de ovelhas mestiças: corpo lúteo, corpo albicans, granulosa, teca interna e teca externa.

Estruturas Ovarianas	Médias (NORs)		P valor
	OD	OE	
Corpo Lúteo	5,00	4,00	0,782 ^{NS}

Corpo Albicans	3,88	4,00	0,815 ^{NS}
Granulosa	7,00	7,00	0,691 ^{NS}
Teca Interna	6,00	6,00	0,307 ^{NS}
Teca Externa	5,00	5,00	0,160 ^{NS}

*significativo a 5%; ^{NS} não significativo; OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo; NORs: regiões organizadoras de nucléolos.

Isso significa que as estruturas proliferam-se de maneira semelhante independente do lado anatômico. No presente trabalho, foram avaliados os maiores folículos de cada ovário (sendo todos terciários) e obteve-se, em sua maioria, pequenas e numerosas NORs, principalmente para as células da granulosa com média de 7 NORs. Dados de Silva et al. (2003) com ratas, embora não tenham trabalhado com folículos terciários, mostraram que os folículos com duas a três camadas celulares possuíam poucos e grandes NORs e os folículos com mais de 5 camadas de células possuíam muitos e pequenos pontos ao contar as NORs de células da granulosa de folículos secundários sem a formação do antro.

Com essas observações, pode-se justificar o uso da técnica de coloração AgNOR para avaliar proliferação celular em células foliculares sadias e não apenas em processos tumorais como mostrou Pich et al. (2000), em revisão de literatura sobre aparelho reprodutor e respiratório de humanos, onde relata que quanto maior o número de NORs, maior a atividade proliferativa das células.

Tabela 4. Correlações das variáveis para a contagem das NORs presentes em 162 ovários, 81 do lado direito (OD) e 81 do lado esquerdo (OE) de ovelhas mestiças coletados em matadouro.

Parâmetros	OD		OE	
	Correlações	P valor	Correlações	P valor
NORs da T.I. e NORs da T.E.	0,468 ^{**}	0,000	0,611 ^{**}	0,000
NORs do CL e NORs da Granulosa	-0,109 ^{NS}	0,462	-0,015 ^{NS}	0,929
NORs do CL e NORs da T.I.	-0,095 ^{NS}	0,539	-0,012 ^{NS}	0,944
NORs do CL e NORs da T.E.	-0,088 ^{NS}	0,568	0,020 ^{NS}	0,912
NORs da Granulosa e NORs da T.I.	0,545 ^{**}	0,000	0,590 ^{**}	0,000
NORs da Granulosa e NORs da T.E.	0,341 ^{**}	0,002	0,389 ^{**}	0,001

*significativo a 1%; ^{NS} não significativo.; NORs: regiões organizadoras de nucléolos; CL: corpo lúteo; T.I.: teca interna; T.E.: teca externa.

Houve correlações positivas ($P < 0,01$) entre NORs da teca interna (TI) e NORs da teca externa (TE) de 0,468 para OD e de 0,611 para OE. Isso deve-se, provavelmente, ao fato de as células da teca serem estimuladas para diferenciação e proliferação celular por vários fatores, dentre eles o hormônio luteinizante (LH), induzindo a luteinização/diferenciação das células da teca; e IGF (fator de crescimento semelhante à insulina): induzindo à proliferação celular, conforme revisão de literatura considerando a espécie ovina (Young e McNeilly, 2010).

As fotomicrografias relativas ao folículo terciário e suas estruturas mostram as NORs (Fig. 2).

LOCAL PARA INSERIR-SE A FIGURA 2.

Também foi obtida correlação positiva ($p < 0,01$) entre NORs da granulosa e NORs da TI de 0,545 para OD e de 0,590 para OE; e entre NORs da granulosa e NORs da TE de 0,341 e 0,389 para OD e OE respectivamente. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de as células da granulosa também estarem em atividade e diferenciação (tanto para produção do líquido antral, como para diferenciação em células luteínicas) e a técnica marca NORs das células no período de síntese protéica e de aumento de volume (Underwood, 1995). Assim, quanto maior a taxa de proliferação celular, maior o número de pequenas NORs (RNA ribossômico), e os valores obtidos para as NORs nessa pesquisa significam que as células da granulosa possuem alta taxa de proliferação para a produção dos hormônios e posterior formação do CL, bem como as células da teca (Hastie e Haresign, 2009).

Não houve correlação entre NORs do CL e dos tipos celulares do folículo (granulosa, T.I. e T.E.), pelo fato de serem células provenientes de estruturas diferentes.

Em virtude da técnica de AgNOR, relacionada ao estudo da proliferação celular em células de estruturas ovarianas saudáveis nos animais domésticos e em especial nas ovelhas, não trazer informações na literatura consultada, recomenda-se que novos estudos sejam realizados para fins de somatória de resultados com o uso da técnica de coloração e contagem de NORs utilizada.

CONCLUSÕES

O estudo em questão demonstra que a técnica de coloração AgNOR em conjunto com a morfometria ovariana é um bom parâmetro para avaliar o potencial proliferativo das células do corpo lúteo, granulosa, teca interna e teca externa.

A quantificação das NORs foi apropriada para determinar o potencial de proliferação de células saudáveis das estruturas ovarianas avaliadas, o qual foi similar para os lados direito e esquerdo.

A técnica de coloração AgNOR foi eficaz para constatar que existe correlação positiva para o potencial proliferativo entre as células da teca interna e teca externa e entre as células da granulosa com ambas as tecas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - Anualpec. São Paulo: AgraFNP, 2010. p.273.

CASIDA, L.E.; WOODY, C.O.; POPE, A.L. Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the ewe. *J. Anim. Sci.*, v.25, n.4, p.1169-1171, 1966.

CHACUR, M.G.M.; VALENTIM, N.C.; MARTINEZ, A.I.S. et al. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. *Acta Sci. Vet.*, v.34, n.1, p.65-70, 2006.

CREMASCO, C.P., GABRIEL FILHO, L.R.A., GABRIEL, L.R.A. Bioestatística e suas Aplicações. Adamantina: Editora Espaço Cultural do Brasil, 2009, v.1, p.198.

CRESTA, F.B.; ALVES, M.R. Avaliação da cinética do epitélio corneano com marcadores de proliferação celular. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.70, n.6, p.953-960, 2007.

CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J. Pathol.*, v.158, p.185-188, 1989.

FIGUEIREDO, J.R. de; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. et al. Manipulação dos Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.;

FIGUEIREDO, J.R. de; FREITAS, V.J. de F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, 2.ed. São Paulo: ROCA, 2008. p.303-328.

FITZ, T.A.; MAYAN, M.H.; SAWYER, H.R. et al. Characterization of Two Steroidogenic Cell Types in the Ovine Corpus Luteum. *Biol. Reprod.*, n.27, p.703-711, 1982.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Anatomia da Reprodução Feminina. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*, 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p.13-30.

HASTIE, P.M. e HARESIGN, W. Modulating peripheral gonadotrophin levels affects follicular expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor binding proteins in sheep. *An. Rep. Sci.*, v.119, n.3, p.198-204, 2010.

HEMAMALINI, N.C.; RAO, B.S.; TAMILMANI, G. et al. Influence of transforming growth factor- α , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of pre antral follicles in sheep. *Small Rum. Res.*, v.50, p.11-22, 2003.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R.R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, v.5, n.6, p.299-314, 1996.

LINDNER, L.E. Improvements in the Silver-staining Technique for Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). *J. Histochem. Cytochem.*, v.41, n.3, p.439-445, 1993.

LÖHR, C.V., TEIFKE, J.P., FAILING, K. et al. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.*, v.34, p.212-221, 1997.

MOAKHAR, H.K.; KOHRAM, H.; SALEHI, R. et al. Follicular and ovulatory responses of the right versus left ovaries to eCG treatment in Shall Iranian ewes. *Afr. J. Biotechn.*, v.9, n.10, p.1523-1527, 2010.

MURRAY, A.W. Recycling the Cell Cycle: Cyclings Revisited. *Cell.*, v.116, p.221-234, 2004.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic relevance of AgNORS in tumor pathology. *Micron.*, v.31, p.133-141, 2000.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nuclear organizer regions at the optical level. *Histochem. J.*, v.18, p.5-14, 1986.

RODRIGUES, P. de A.; COELHO, L. de A.; NONAKA, K.O. et al. Annual characteristics of estrous activity in wool and hair ewe lambs under subtropical conditions. *Sci. Agric.*, v.64, n.5, p.468-475, 2007.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rum. Res.*, v.48, p.155-171, 2003.

SANCHES, O. de C. *Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica*. 2010. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SASA, A.; TESTON, D.C.; RODRIGUES, P. de A. et al. Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Borregas Lanadas e Deslanadas no Período de Abril a Novembro, no Estado de São Paulo. *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.3, p.1150-1156, 2001.

SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; NASCIMENTO, E.F. et al. Quantificação das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetro para avaliar a proliferação das células da granulosa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.1, p.113-116, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352003000100019&script=sci_arttext>.

Acessado em: 18 abr. 2010.

SIMPLICIO, A.A.; SALLES, H.O.; SANTOS, D.O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. *Rev. Bras. Rep. An.*, v.Supl., n.5, p.17-27, 2002.

SISSON, S. Aparelho Urogenital do Ruminante. In: SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. *Anatomia dos animais domésticos*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.1. p.879-895.

SOUZA, M.I.L.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; OBA, E. et al. Secreção de esteróides ovarianos, em ovelhas mestiças de raças exploradas para corte, em distintos momentos reprodutivos, no estado de São Paulo. *Ciê. Anim. Bras.*, v.9, n.4, p.1107-1113, 2008.

TASENDE, C.; MEIKLE, A.; RODRÍGUEZ-PIÑÓN, M. et al. Estrogen and progesterone receptor content in the pituitary gland and uterus of progesterone-primed and gonadotropin releasing hormone-treated anestrous ewes. *Theriogenology.*, v.57, p.1719-1731, 2002.

TRALDI, A. de S. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: FEIRA INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 3., 2006, Pirassununga. *Anais...* Pirassununga: [s.n] 2006, p.1-11.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. *Micron.*, v.31, p.127-131, 2000.

UNDERWOOD, J.C. AgNOR measurements as indices of proliferation, ploidy and prognosis. *J. Clin. Pathol.*, v.48, n.5, p.239-240, 1995.

URIBE-VELASQUEZ, L.F.; OBA, E.; SOUZA, M.I.L. Efeitos da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.1, p.58-65, 2008.

YOUNG, M.J. e MCNEILLY, A.S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, v.140, n.4, p.489-504, 2010.

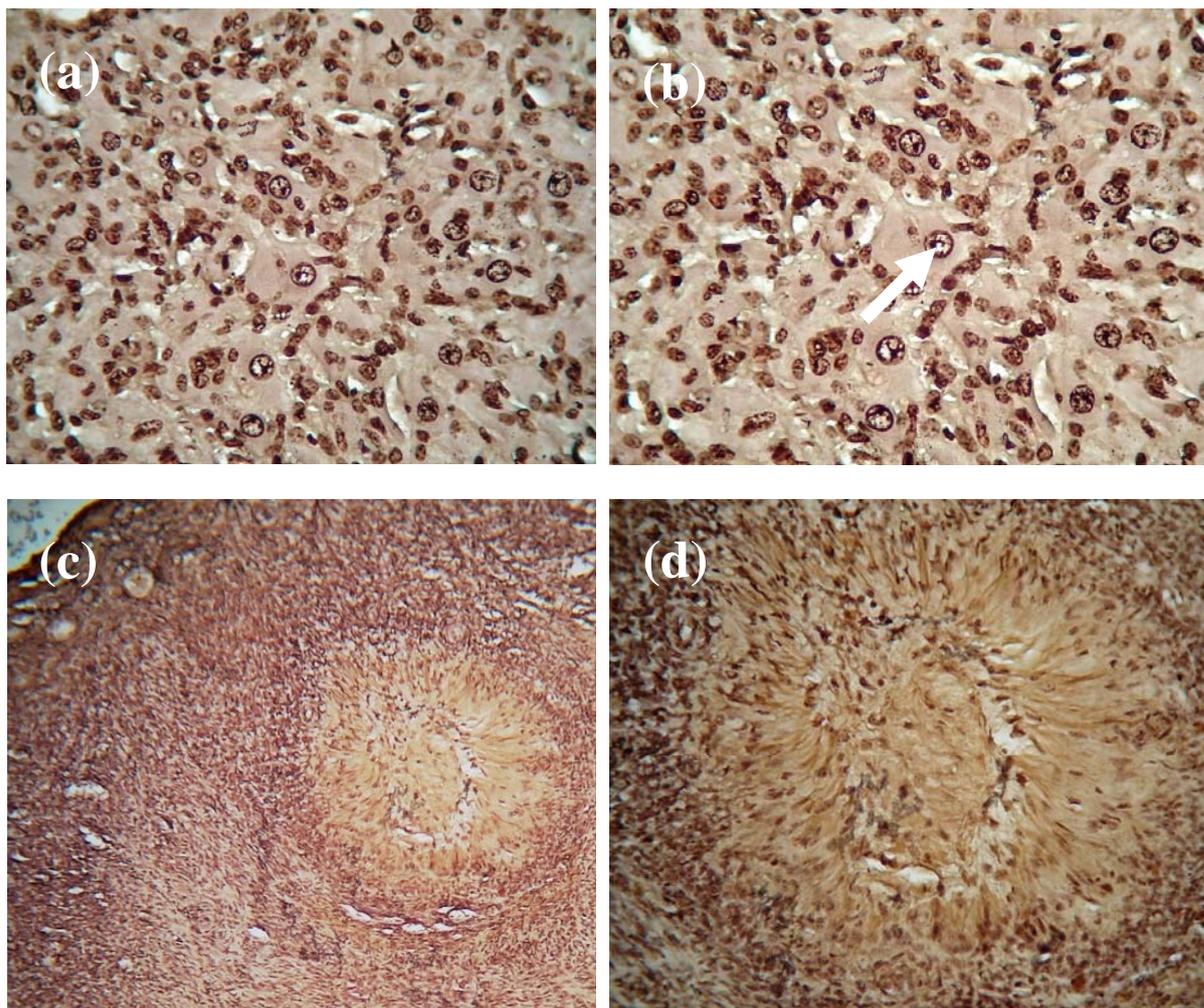


Figura 1 - Fotomicrografia de corte de ovário de ovelha, onde se observa as NORs (seta). Corpo lúteo na magnitude de (400X) (a) e de (1000X) com células possuindo grandes NORs ao centro do núcleo e pequenas na periferia (b), Corpo albicans na magnitude de (100X) (c) e de (400X) (d).

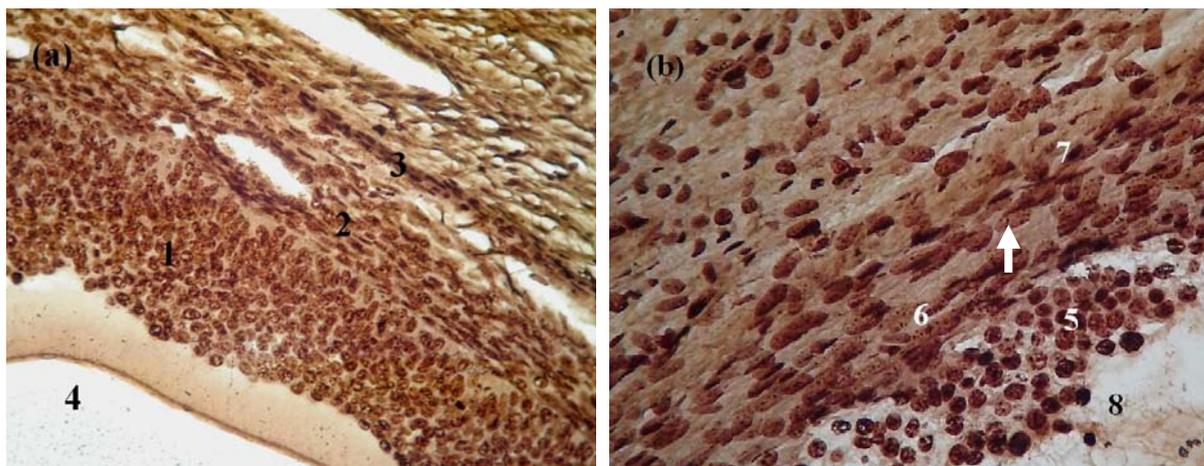


Figura 2 - Fotomicrografia de corte de ovário de ovelha, onde se observa as pequenas NORs (seta). Folículo antral na magnitude de (400X) onde: 1-granulosa, 2-teca interna, 3-teca externa, 4-antra (a); Folículo terciário na magnitude de (1000X) onde: 5-granulosa, 6-teca interna, 7-teca externa, 8-antra (b).

Morfometria de corpos lúteos de ovelhas mestiças coletados em abatedouro

Morfometry of crossbred ewes corpus luteum collected in slaughterhouse

Thaís Andressa Hernandes Arrebola¹; Daniel Boabaid Ibrahim¹; Marcelo George Mungai Chacur^{2*}; Osimar Carvalho Sanches³; Luis Roberto A. Gabriel Filho⁴

-1- Discentes do Mestrado em Ciência Animal - UNOESTE - Presidente Prudente, SP.

-2- Laboratório de Reprodução Animal - (UNOESTE – Campus II), Rod. Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro, CEP19067-175, Presidente Prudente-SP/Brasil. Fone:(18)32292077, Fax:(18)32292036 . E-mail: chacur@unoeste.br.

-3- Laboratório de Patologia Veterinária - UNOESTE - Presidente Prudente, SP.

-4- Universidade Estadual Paulista - UNESP - Tupã, SP.

Morfometria de corpos lúteos de ovelhas mestiças coletados em abatedouro

Morfometry of crossbred ewe corpus luteum collected in slaughterhouse

Resumo

O estudo da morfometria ovariana está diretamente ligado as suas aplicações na realização e interpretação do ciclo estral e para uso de biotécnicas da reprodução na ovinocultura. Foram colhidos em abatedouro 102 pares de ovários identificados em ovário direito (OD) e esquerdo (OE), armazenados e transportados em solução salina a 37°C para os laboratórios de Reprodução e de Patologia Animal da UNOESTE. Obteve-se a morfometria, o volume e o peso de cada gônada. Do maior folículo de cada ovário mensurou-se o diâmetro e do maior corpo lúteo (CL), o diâmetro e a largura, classificando-os de acordo com tipos: incluso, protruso, maciço e cavitário. Dos 204 ovários coletados, 42,65% possuíam CL. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre OD e OE para a presença de CL. Houve predomínio do CL maciço e incluso, seguido pelo maciço e protruso. Houve homogeneidade entre os ovários direito e esquerdo para a presença de corpos lúteos, sugerindo que ambos os lados possuem CL e ciclos com a mesma frequência.

Palavras-chave: Ovelha, morfometria, corpo lúteo, ovários

Abstract

The study of ovarian morphology is directly linked to their applications on doing and interpret the estrous cycle and for the biotechnologies of reproduction applications in the sheep industry. We collected 102 pairs of ovaries in a slaughterhouse that was identified in right (OD) and left ovary (LE), stored and transported in saline at 37 °C for Reproduction's lab and Animal Pathology's lab of UNOESTE. We obtained the morphometry, volume and weight of each gonad. Was measured from the largest follicle of each ovary the diameter and from the largest corpus luteum (CL), the diameter and width, classifying them according to types: included, protuberant, massive and cavity. Of the 204 ovaries collected, 42.65% had CL. There was no significant difference ($P>0.05$) for the presence of CL between right and left sides. Predominated massive and included CL, followed by massive and protuberant. There was homogeneity between the right and left ovaries for the presence of corpus luteum, suggesting that both sides have CL and cycles with the same frequency.

Key words: Ovelha, morfometria, corpo lúteo, ovários

Introdução

A ovinocultura brasileira tem se expandido bastante nesses últimos anos, segundo o Anuário da Pecuária Brasileira de 2010, com cerca de 52% em 8 anos e demanda para a produção de carne e peles. O estudo da morfometria ovariana está diretamente ligado as suas aplicações na realização e interpretação do ciclo estral, bem como para o uso das biotécnicas da reprodução na ovinocultura que atualmente ocupa um lugar de importância nos criatórios de interesse zootécnico (SIMPLICIO et al., 2002).

Para a manipulação do ciclo estral e utilização das biotécnicas há a necessidade de conhecer a anatomia dos ovários (TRALDI, 2006).

Os órgãos genitais femininos responsáveis pelo crescimento e maturação dos oócitos são os dois ovários. Na ovelha, os ovários têm forma de amêndoa, têm cerca de 1,5cm de comprimento e pesam em torno de 3 a 4 gramas (SISSON, 1986). São constituídos de um epitélio superficial ou germinativo, que circunda a medula e a córtex (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As células do CL são células da teca interna e da membrana granulosa hipertrofiadas e poliédricas. Com o aporte sanguíneo adequado, essas células são então denominadas células luteínicas grandes e pequenas. Possuem um redondo e volumoso núcleo central e o citoplasma é cheio de vacúolos de tamanhos variados contendo colesterol e progesterona. Antes do estro, as células tem seu tamanho reduzido e quando o CL fica velho, sofre degeneração e é chamado de corpus albicans (FITZ et al., 1982).

O tecido do CL, durante sua formação, pode proliferar ocupando apenas a área interior ou formando um ápice na superfície do ovário (NEVES et al., 2002). Na espécie bovina, devido ao preenchimento incompleto da cavidade folicular pelas células no processo de luteinização, também podem existir CL com presença ou ausência de cavidade (CHACUR et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi estudar as características morfométricas de ovários de ovelhas mestiças (lanadas x deslanadas), não prenhes, coletados em abatedouro.

Material e Métodos

Foram coletados em abatedouro pertencente ao município de Promissão-SP (altitude: 426m, latitude: 21°32'12"S, longitude: 49°51'29"O), imediatamente após o abate e evisceração

dos animais, 102 pares de ovários pertencentes à ovelhas mestiças (lanadas x deslanadas), grandes e pequenas, entre 6 e 12 meses de idade, não prenhes, nos meses de março a maio (final do verão/outono) de 2010.

As gônadas foram identificadas conforme o lado em ovário direito (OD) e ovário esquerdo (OE) em sacos individuais para cada par de ovários, armazenados e transportados em solução salina a 37°C, durante 3 horas, para os laboratórios de Reprodução Animal e de Patologia Veterinária da UNOESTE. Realizou-se a análise morfométrica com o auxílio de um paquímetro, de modo a verificar o comprimento (cm) no eixo maior; a largura (cm), no eixo entre o pedículo do ovário e a extremidade oposta; e a altura (cm), no eixo de 90° em relação à largura.

Com a imersão dos ovários em proveta graduada contendo solução fisiológica o volume (mL) das gônadas foi obtido e com o auxílio de uma balança digital aferiu-se o peso (g) dos ovários.

A classificação dos folículos avaliados foi realizada de acordo com FIGUEIREDO et al. (2008), na qual folículos terciários possuem diâmetro igual ou superior a 119µm.

O maior folículo de cada ovário foi identificado macroscopicamente, antes do corte longitudinal, e mensurado quanto ao seu diâmetro (cm). Após o corte longitudinal, o corpo lúteo (CL) foi avaliado quanto ao diâmetro (cm) e largura (cm), sendo a área definida pelo cálculo a partir da área da elipse, determinada pela relação $\text{Área} = \pi \cdot D \cdot L / 4$, onde: D representa o diâmetro e L a largura do CL. Os CL também foram classificados de acordo com os tipos em: incluso, protruso, maciço e cavitário, conforme CHACUR et al. (2006).

A análise dos dados da morfometria ovariana foi obtida a partir dos resultados das médias, que foram submetidos, para os grupos com distribuição normal, à análise de variância pelo teste F (CREMASCO et al., 2009) para observações pareadas, conforme delineamento inteiramente casualizado.

Modelo matemático:

$$x_{ij} = m + t_i + e_{ij},$$

em que: x_{ij} = valor observado na parcela do lado i e repetição j; m = média geral; t_i = efeito do lado i; e_{ij} = efeito do acaso.

Para os grupos com distribuição não normal, foi realizada a análise de variância utilizando o teste de Friedman. Em todos os testes, o nível de significância considerado foi de 5 %, sendo utilizado o programa computacional *R Statistical System* (IHAKA; GENTLEMAN, 1996) para a realização das análises estatísticas.

Para alguns pares de medições de interesse foi calculado o coeficiente de correlação linear por meio do teste t de Student. Para o número de CL foi aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2).

Foi utilizada a correlação de Spearman em virtude dos *ranks* de classificação dos dados para a Técnica de coloração AgNor.

Resultados e Discussão

De maneira geral, a espécie ovina, em especial as raças lanadas, apresentam estacionalidade reprodutiva nas altas latitudes, sendo os ciclos controlados por fatores relacionados à diminuição da luminosidade da estação, ou seja, a atividade ovariana começa no final do verão e termina com o início da primavera (ROSA; BRYANT, 2003).

Em localização geográfica próxima à do presente estudo desenvolvido com as ovelhas mestiças, SASA et al. (2001) na região localizada em 21°59'S, 47°26'O (Pirassununga, SP), relataram que fêmeas da raça Santa Inês (deslanadas) sofriam pouca influência do fotoperíodo, em contrapartida, fêmeas das raças Romney Marsh e Suffolk (lanadas) tiveram anestro observado a partir de agosto.

Dados obtidos por SOUSA et al. (2008), com ovelhas mestiças (Sulfolk x Ile de France) na latitude 22°53'S e longitude 46°29'O (Botucatu, SP), comprovaram atividade reprodutiva durante todo o ano.

Para as correlações entre as estruturas encontradas nos ovários, como peso (g) e volume (mL) do OE e, volume (mL) e área do CL, houve correlação positiva ($p < 0,01$). Em contrapartida, não houve diferença ($p > 0,05$) entre peso e volume do OD e entre diâmetro do maior folículo e área do CL (Tabela 1). Para o número de CL quanto aos diferentes tipos, não houve diferença ($p > 0,05$) significativa (Tabela 2).

Com relação à morfologia dos CL (Tabela 3), houve predominância de estrutura do tipo maciço (75,86%) e incluso (59,77%) sobre os tipos cavitário (24,14%) e protruso (40,23%) nos 87 ovários com presença da estrutura. Para a espécie ovina, conforme a literatura consultada, não há informações referentes à classificação dos CL. Para fins de comparação, adotamos a espécie bovina, conforme abaixo descrito.

Tabela 1. Correlações entre o peso e o volume do ovário direito (OD) e esquerdo (OE), do volume do ovário direito (OD) e esquerdo (OE) com a área do corpo lúteo (CL), e dos diâmetros dos folículos direito (FOLD) e esquerdo (FOLE) com a área do corpo lúteo (CL), de pares de ovários de vacas.

Parâmetros	Correlações	P valor
Peso OD e Volume OD	0,104 ^{NS}	0,298
Peso OE e Volume OE	0,975*	0,000
Volume OD e área CL	0,417*	0,000
Volume OE e área CL	0,314*	0,004
Diam. Folículo OD e área CL	-0,011 ^{NS}	0,925
Diam. Folículo OE e área CL	0,185 ^{NS}	0,093

** significativo a 1%; ^{NS} não significativo a 5%; OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo; Diam.: diâmetro.

Tabela 2. Número de corpos lúteos (CL) cavitários ou maciços; e inclusos ou protrusos de pares de ovários de ovelhas não prenhes.

CL	OD	OE	Total	Teste de Qui-quadrado (χ^2)
CL cavitário e incluído	7	4	11	$\chi^2 = 0,82^{\text{NS}}$
CL cavitário e protruído	4	6	10	$\chi^2 = 0,40^{\text{NS}}$
CL maciço e incluído	21	20	41	$\chi^2 = 0,02^{\text{NS}}$
CL maciço e protruído	12	13	25	$\chi^2 = 0,04^{\text{NS}}$
Total			87	

^{NS} não significativo a 5%.

Vale destacar que os CL classificados nas ovelhas do presente estudo apresentavam coloração amarela intenso, sugestiva de CL maduros baseando-se na classificação de CHACUR et al (2006). A porcentagem de CL cavitários foi semelhante ao encontrado por CHACUR et al. (2006), em fêmeas zebus *Bos taurus indicus* de 26,41% CL cavitários do total de CL; e diferente na porcentagem de CL inclusos com 26,20% do total de ovários com a presença da estrutura.

No presente estudo, observa-se que os lados possuem CL ciclando com frequência similar (Tabela 3). Os dados obtidos foram semelhantes aos de MOAKHAR et al. (2010),

apesar de sugerirem que os OD produzam mais CL e parecem contribuir mais na resposta para múltiplas ovulações que os OE.

Tabela 3. Número e porcentagem de corpos lúteos (CL) maciços ou cavitários; inclusos ou protrusos no ovário direito (OD) ou esquerdo (OE) de 102 pares de ovários de ovelhas, recuperados em matadouro.

Característica do ovário	n	(%)
CLOD	44	50,57
CLOE	43	49,43
Total de ovários com CL	87	100
CL cavitário	21	24,14
CL maciço	66	75,86
CL incluso	52	59,77
CL protruso	35	40,23
Total de ovários com CL	87	

Observou-se que do total de 204 ovários, 42,65% (87) possuíam CL e desses, 50,57% (44) estavam presentes no lado direito e 49,43% (43) no lado esquerdo, diferente dos dados encontrados por FUERST et al. (2009) que obtiveram 83% de ovários com CL.

Os CL em ovelhas foram classificados em quatro tipos: incluso e maciço, incluso e cavitário, protruso e maciço e protruso e cavitário (ARREBOLA et al., 2011), na Fig. 1 pode-se observar o CL maciço e incluso e o CL cavitário e protruso.

LOCAL PARA INSERIR A FIGURA 1.

Conclui-se que houve predomínio do CL maciço e incluso, seguido pelo maciço e protruso. Houve homogeneidade entre os ovários direito e esquerdo para a presença de corpos lúteos, sugerindo que ambos os lados possuem CL e ciclos com a mesma frequência.

Referências Bibliográficas

ARREBOLA, T.A.H.; IBRAHIM, D.B.; CHACUR, M.G.M.; SANCHES, O.C.; GABRIEL FILHO, L.R.A.; OBA, E. Morfologia de corpos lúteos de ovelhas da raça Santa Inês coletados

em matadouro. In: XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2011, Recife. **Anais...** XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 25 a 27 de maio, Recife-PE, 2011, v.19.

CHACUR, M.G.M.; OBA, E.; KRONKA, S.N. Correlações entre morfometria ovariana e hormônios em vacas zebus não prenhes. **Arch. Zootec.**, v.58, p.1-4, 2009.

CHACUR, M.G.M.; VALENTIM, N.C.; MARTINEZ, A.I.S., TOSTES, R.A.; KRONKA, S. do N. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. **Acta Sci. Vet.**, v.34, n.1, p.65-70, 2006.

CREMASCO, C.P., GABRIEL FILHO, L.R.A., GABRIEL, L.R.A. **Bioestatística e suas Aplicações**. Adamantina: Editora Espaço Cultural do Brasil, 2009, v.1, p.198.

FIGUEIREDO, J.R. de; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. et al. Manipulação dos Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R. de; FREITAS, V.J. de F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2.ed. São Paulo: ROCA, 2008. p.303-328.

FITZ, T.A.; MAYAN, M.H.; SAWYER, H.R. et. al. Characterization of Two Steroidogenic Cell Types in the Ovine Corpus Luteum. **Biol. Reprod.**, n.27, p.703-711, 1982.

FUERST, K. J.; BARTLEWSKI, P. M.; KING, W. A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrus ewes following a multiple-dose pFSH regimen. **Small Ruminant Res.** 2009, doi:10.1016/j.smallrumres.2009.01.014.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Feminina. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 13-30.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R.R: A language for data analysis and graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v.5, n.6, p.299-314, 1996.

MOAKHAR, H.K.; KOHRAM, H.; SALEHI, R. et al. Follicular and ovulatory responses of the right versus left ovaries to eCG treatment in Shall Iranian ewes. **Afr. J. Biotechn.**, v.9,

n.10, p.1523-1527, 2010.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Rum. Res.**, v.48, p.155-171, 2003.

SASA, A.; TESTON, D. C.; RODRIGUES, P. de A.; COELHO, L. de A.; SCHALCH, E. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro, no Estado de São Paulo. **R. Bras. Zootec.** Viçosa, v.31, n.3, p. 1150-1156, jun. 2002.

SIMPLICIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** Belo Horizonte, v.Supl., n.5, p.17-27, 2002.

SISSON, S. Aparelho Urogenital do Ruminante. In: SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos animais domésticos.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.1. p. 879-895.

SOUZA, M. I. L.; OBA, E. ; URIBE-VELASQUEZ, L. F.; RAMOS, A. A. Secreção diária de estradiol, progesterona e hormônio folículo estimulante (FSH) em ovelhas durante o anestro estacional. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v.5, n. 1, p. 15-20, jan./jun. 2002.

TRALDI, A. de S. **Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes.** In: FEINCO, 3, 2006, Pirassununga.

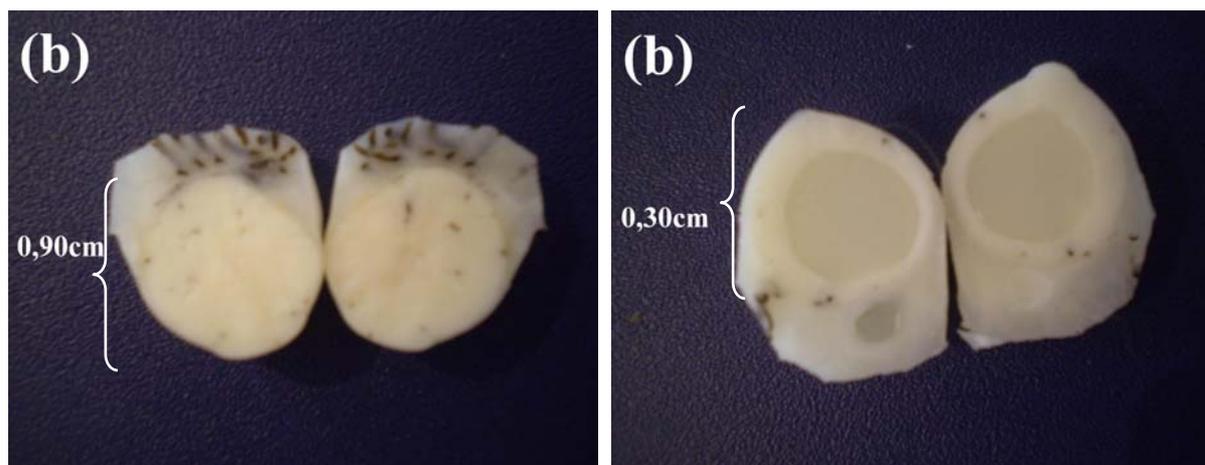


Figura 1 – Macroscopia de ovário de ovelha, onde se observa o Corpo Lúteo maciço e incluso (a), e cavitário e protruso (b).

ANEXOS

ANEXO A – Instruções aos autores – Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ANEXO B - Normas editoriais para publicação na Semina: ciências agrárias.

ANEXO 1

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
(*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arq. Bras.Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Reprodução de artigos publicados: A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa. Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em

Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract. Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971);
(Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88. FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostrídios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critcal16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de publicação

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente trabalhos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

ANEXO 2

Normas editoriais para publicação na Semina: ciências agrárias

A revista Semina: Ciências Agrárias, com periodicidade trimestral, é uma publicação de divulgação científica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Tem como objetivo publicar artigos, comunicações, relatos de casos e revisões relacionados às Ciências Agrônômicas, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Medicina Veterinária, Zootecnia e áreas afins.

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 35 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português, inglês ou espanhol e devem ser enviados em três cópias impressas em papel A4, com espaçamento duplo, elaborado no editor de texto Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 12 normal, com margens esquerda e direita de 2,5 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas, de acordo com a categoria do trabalho. Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem estar separadas no final do trabalho. As figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões. As legendas das figuras deverão ser colocadas em folha separada obedecendo à ordem numérica de citação no texto. Fotografias devem ser identificadas no verso e desenhos e gráfico na parte frontal inferior pelos seus respectivos números do texto e nome do primeiro autor. Quando necessário deve ser indicado qual é a parte superior da figura para o seu correto posicionamento no texto.

Preparação dos manuscritos**Artigo científico:**

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras); Abstract com Key-words (no máximo seis palavras); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final ou Resultados, Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser escritos em letras maiúsculas e minúsculas e destacados em negrito, sem numeração. Quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem receber números arábicos. O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo de congresso, nota prévia ou formato reduzido.

Na primeira página do manuscrito devem constar as seguintes informações:

1. *Título do trabalho:* O título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo palavras que permitam ao leitor ter uma idéia do conteúdo do artigo.

2. *Nomes dos autores*: Deverão ser escritos por extenso, separados por ponto e vírgula, logo abaixo do título do trabalho. A instituição, os órgãos de fomento e a identificação dos autores deverão ser feitos por inserção numérica de notas de rodapé ao final do título e dos nomes. O autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e E-mail deverá ser destacado com um asterisco sobrescrito junto ao seu número de identificação.

A partir da segunda página do manuscrito a apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. *Título do trabalho*, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. *Resumo e Palavras-chave*: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 150 e um máximo de 300 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3. *Introdução*: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4. *Material e Métodos*: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. *Resultados e discussão com conclusões ou Resultados, Discussão e Conclusões*: De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.

6. *Agradecimentos*: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Quando for o caso, antes das referências, deve ser informado que o artigo foi aprovado pela comissão de bioética e foi realizado de acordo com as normas técnicas de biosegurança e ética.

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

282

Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 1, jan./mar. 2010

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos: Deverá obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

7. *Citações dos autores no texto*: Deverá seguir o sistema de chamada alfabética escrita com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

Os resultados de DUBEY (2001) confirmam que o.....

De acordo com SANTOS et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....

Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....

.....e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).

.....comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

8. *Referências Bibliográficas*: As referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes (única exceção à norma – item 8.1.1.2). A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologia completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a seqüência – introdução, metodologia, resultados (podem ser incluídas tabelas e figuras), discussão, conclusão e referências bibliográficas.

Relato de caso

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, achados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agrônômico, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os colaboradores poderão ser convidados a apresentar artigos de interesse da revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusão; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

1. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na Semina Ciências Agrárias, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.
2. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica “*Ad hoc*” e da aprovação do Comitê Editorial da Semina Ciências Agrárias, UEL.
3. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/proppg/semina>).
4. Os trabalhos não aprovados para publicação serão devolvidos ao autor.
5. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.
6. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
7. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina
Londrina
Centro de Ciências Agrárias
e Pós-graduação
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
das revistas Semina

Universidade Estadual de
Londrina
Coordenadoria de Pesquisa
e Pós-graduação
Conselho Editorial

Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias
Universitário - Caixa Postal 6001

Campus Universitário - Caixa Postal 6001

Brasil.

86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

33714105

Informações: Fone: 0xx43 33714709

4320

Fax: 0xx43 33714714

eglema@uel.br

E-mails: vidotto@uel.br; csvjneve@uel.br

www.uel.br

Campus

86051-990, Londrina, Paraná,

Informações: Fone: 0xx43

Fax: 0xx43 3328

E-mail:

Home

page: