



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LINA CASTELO BRANCO MOTTA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS**  
**SUÍNOS SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRANSPORTE**

**FORTALEZA**

**2016**

**LINA CASTELO BRANCO MOTTA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS  
SUÍNOS SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRANSPORTE**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. José Roberto Feitosa Silva

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M874a Motta, Lina Castelo Branco.  
Avaliação histológica da viabilidade de folículos ovarianos suínos submetidos a diferentes condições de transporte / Lina Castelo Branco Motta. – 2016.  
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Feitosa Silva.

1. Maturação folicular. 2. Conservação folicular. 3. Biotécnicas reprodutivas. I. Título.

CDD 570

---

**LINA CASTELO BRANCO MOTTA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS  
SUÍNOS SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRANSPORTE**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Roberto Feitosa Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Cavalcante Hissa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer àqueles que não só me ajudaram na construção deste trabalho, mas também aos que partilham comigo ideias e sentimentos.

Aos meus pais, Ana Lúcia Castelo Branco e Adauto Gouveia Motta Júnior, que serviram por toda minha vida como impulso para todas as minhas realizações tornando possíveis, mesmo nos momentos de dificuldade, todas as minhas conquistas.

Aos meus familiares, em especial minha irmã Clara Castelo Branco e cunhado Dalmo Gomes, por todo auxílio e compartilhamento de experiências.

Ao meu namorado, Pedro Afonso Guimarães, por todo o companheirismo, amor, paciência e apoio dados, inclusive nos meus momentos de falha.

Ao Dr. José Roberto Feitosa Silva, professor e orientador, que me orientou desde o início da graduação me introduzindo na área da embriologia, despertando minha curiosidade em busca desta área de atuação. Agradeço pela disponibilidade, crítica, sugestões, apoio e amizade.

Ao Robson de Jesus Mendes, técnico do laboratório de histologia, por todo o auxílio dado no desenvolvimento deste trabalho, sempre se disponibilizando a ajudar e me acalmando nos meus momentos de desespero.

Aos doutores Vicente José de Figueiredo Freitas e Luciana Magalhães Melo, professores orientadores do meu estágio no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), que foram extremamente importantes para o início da minha vida profissional e crescimento pessoal.

Às professoras Dra. Carminda Sandra Brito Salmite Vanderley e Dra. Denise Cavalcante Hissa, que gentilmente aceitaram o convite para participar da banca de avaliação.

À equipe do Laboratório de Histologia e Embriologia Animal, pelo auxílio na construção deste trabalho, especialmente ao Fred, que me auxiliou com os dados estatísticos, e Cíntia, se propondo sempre a ajudar, criticando e dando sugestões para a melhoria dos resultados.

À professora Dra. Ana de Fátima e à equipe do Laboratório de Bioprospecção, por terem, literalmente, aberto várias vezes as portas do laboratório para o auxílio da parte metodológica.

Aos estudantes e iniciação científica e pós-graduandos do LFCR (incluindo também Ríbrio Batista e Maajid Hassan) por toda a amizade conquistada e ensinamento

partilhado, especialmente à Lívia Magalhães, estudante de doutorado, que me adotou no início do estágio, ensinando pacientemente toda a técnica que eu sei hoje.

Aos meus amigos que a UFC me presenteou, em especial Lara Furtado, Sara Gomes, Taynah Fernandes e Ithala Saldanha, amigas que conheci no meu curso anterior à ciências biológicas e levo pra vida, além dos amigos da "creche" e agregados, em especial Marianny Kellen, Luna Vasconcelos, Gabriela Ley e Fernanda Corpe, por todo o companheirismo, principalmente nos lanches do seu Diniz, nas sonecas do centro de ciências.

Aos meus amigos que a vida me presenteou, em especial Rafael Melo e Linda Farias, por todo ombro fornecido, por toda alegria dada e todo amor compartilhado.

Ao Pablo Rodrigo da Silva, secretário da coordenação do curso de ciências biológicas, que me auxiliou com toda a burocracia necessária para a conclusão deste curso.

À todos os professores da graduação da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos e contribuição para minha formação.

## RESUMO

As biotecnologias reprodutivas têm progredido nos últimos anos, porém, em comparação a outros campos da ciência, seu avanço é lento. Estudos que visem a obtenção de melhores resultados dos protocolos de reprodução contribuem para o avanço dessa área de conhecimento. Oócitos utilizados em pesquisa, em sua maioria, são provenientes de ovários obtidos em abatedouros ou fazendas, que muitas vezes estão em áreas geográficas distantes de laboratórios especializados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de folículos ovarianos suínos em diferentes condições de transporte para identificar a que melhor se adeque ao sucesso do tratamento. Ovários suínos (32) foram obtidos em abatedouro local, sendo um par utilizado como grupo controle, fixado em formol 10% ainda no local. Os demais pares de ovários foram imersos em solução salina 0,9% e mantidos nas temperaturas de 4 e 35,5 °C pelos períodos de 2, 16 e 24 horas. Após os referidos tempos de armazenamento, os ovários foram fixados em formol 10% por 24 horas e submetidos à realização de rotina histológica com impregnação em parafina. As secções foram analisadas com microscopia de luz a fim de avaliar a morfologia dos foliculos antrais sendo analisados no máximo 30 folículos por secção. Após a análise pôde-se verificar que folículos antrais de tecidos ovarianos conservados a 4 e 35,5 °C pelo periodo de 2 horas não apresentaram diferença significativa do grupo controle ( $p>0,05$ ), bem como os tratamentos de 4 °C durante 16 e 24 horas. Porém, os tratamentos a 35,5 °C por 16 e 24 horas apresentaram significativa redução da frequência de folículos normais em comparação com os tratamentos de mesmo período de conservação a 4 °C e com o grupo controle ( $p<0,05$ ). Em conclusão, o armazenamento ideal de tecido ovariano suíno para torná-lo viável para experimentos de reprodução pode ser realizado a 35,5 °C por 2 horas ou ainda a 4 °C por até 24 horas.

Palavras-chave: maturação folicular, conservação folicular, biotécnicas reprodutivas

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 - Ilustração de ovário mamífero.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2 - Esquema ilustrando a oogênese em mamíferos.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 3 - Estágios de crescimento folicular.....</b>	<b>16</b>
<b>Gráfico 1 - Gráfico demonstrando a relação do diâmetro folicular durante os dias de recrutamento.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4 - Ilustração dos estágios da morte celular programada.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5 - Ilustração dos estágios celular por necrose.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6 - Exemplos de folículos em crescimento classificados como normais ou degenerados.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 7 - Fluxograma do protocolo experimental de conservação dos ovários suínos.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8 - Esquematização dos protocolos histológicos de desidratação, diafanização e impregnação dos ovários.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 9 - Exemplos de classificação da morfologia folicular.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 10 - Fotomicrografia de tecido ovariano de suínos do grupo controle.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 11 - Fotomicrografias de tecido ovariano de suínos armazenado em diferentes temperaturas por 2 horas.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 12 - Fotomicrografias de tecido ovariano de suínos armazenado em diferentes tempos a 35,5 ° C.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 13 -Fotomicrografia de tecido ovariano de suínos armazenado por diferentes tempos a 4 ° C.....</b>	<b>32</b>
<b>Gráfico 2 - Frequência de folículos morfologicamente normais (FFN) em cada tratamento de conservação e controle, analisados em secções histológicas.....</b>	<b>33</b>



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 . Ovários de mamíferos.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 . Oogênese.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 . Desenvolvimento folicular.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.1. Folículo primordial.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2. Folículos em desenvolvimento.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2.1. Folículo primário.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.2. Folículo secundário.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.3. Folículo terciário.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.4. Folículo maduro ou de Graaf.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.5. Corpo lúteo.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4. Onda folicular e a ovulação.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5. Atresia folicular.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5.1. Apoptose.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5.2. Necrose.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6. Preservação de ovários no transporte.....</b>	<b>21</b>
<b>2.7. Análise histológica da morfologia folicular.....</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Objetivo geral.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Origem, coleta e transporte de ovários.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Procedimentos histológicos.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Análise da morfologia de folículos antrais.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4. Análises estatísticas.....</b>	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente é grande o interesse em desenvolver metodologias mais eficientes nos protocolos de reprodução assistida devido às suas técnicas ainda serem consideradas um ramo deficiente em comparação a outros campos da ciência (VAJTA *et al.*, 2010). Na maioria das espécies analisadas por estas biotécnicas reprodutivas, os oócitos maturados *in vitro* possuem taxas bem menores de desenvolvimento em comparação aos oócitos maturados *in vivo* (YANG *et al.*, 2001). Devidos a estes resultados, desenvolver sistemas apropriados para melhores taxas *in vitro* possibilitam uma eficácia maior no processo.

A preservação dos ovários durante o transporte ao laboratório é um dos itens com especial relevância para estas biotécnicas, principalmente em casos de animais ameaçados de extinção ou quando o doador do órgão se encontra distante de laboratórios especializados, como geralmente é o caso de animais de fazendas ou abatedouros. Para estes casos, é necessária a realização de protocolos de conservação visando melhorar as condições de transporte, com o objetivo de manter a viabilidade celular até o momento de sua manipulação. Alguns estudos já foram desenvolvidos em diferentes animais para avaliar qual a condição ideal para este transporte a curto prazo, visando, principalmente, a preservação de folículos pré-antrais (LUCCI *et al.*, 2007). Porém, grande parte das técnicas reprodutivas utilizam oócitos provenientes de folículos antrais, ou seja, estudos que visem a melhoria dos protocolos de preservação destes folículos possuem um valor especial em virtude de já estarem próximos a ovulação. Como a comunicação entre as células foliculares e o oócito é bidirecional, (BASSO & ESPER, 2002), uma melhor compreensão dos processos deste conjunto, ao contrário do estudo do gameta isolado, irá produzir maior conhecimento e conseqüentemente promover a capacidade de desenvolvimento do oócito (SUTTON *et al.*, 2003).

Para um melhor entendimento deste trabalho, serão abordados temas como: morfologia ovariana, oogênese, desenvolvimento folicular, onda folicular, ovulação, atresia folicular e a preservação do ovário no transporte.

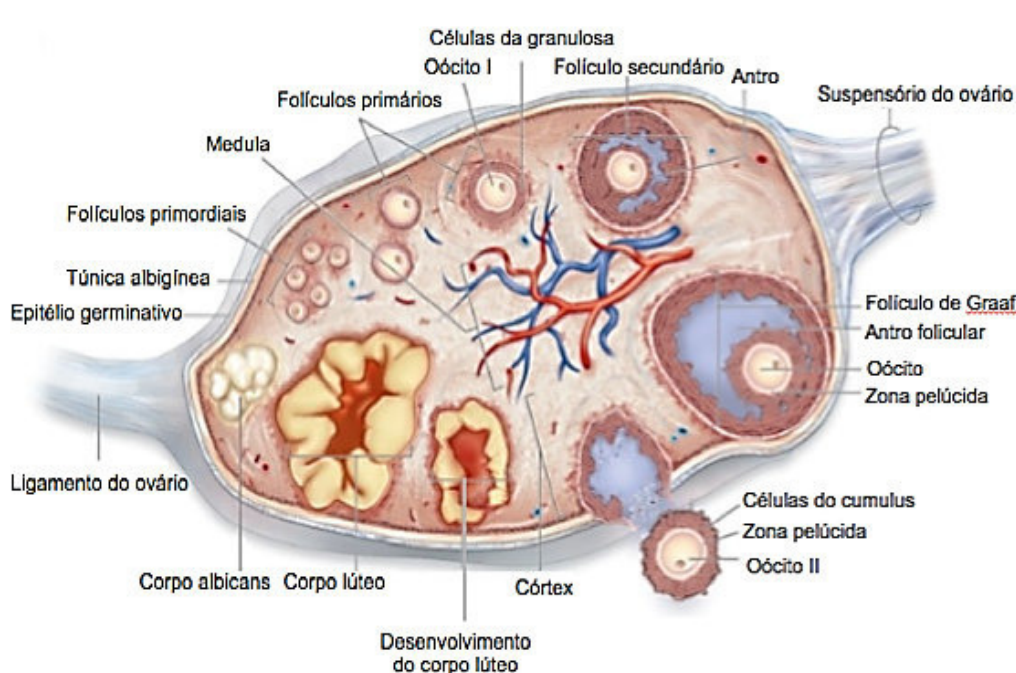
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ovários de mamíferos

O aparelho reprodutor feminino é composto de ovários, tuba uterina, útero, canal vaginal e genitália externa; o ovário é um órgão que desempenha funções exócrinas – liberação de gametas – e endócrinas – esteroidogênese, que permite o desenvolvimento das características sexuais femininas secundárias e o suporte da gestação (HAFEZ & HAFEZ, 2004a).

O ovário possui tamanho e formato variados de acordo com a espécie e ciclo estral, sendo em suínos semelhante a um cacho de uvas em decorrência dos folículos salientes; é constituído por duas regiões: cortical e medular; o córtex tem sua superfície composta por um epitélio cúbico simples, o epitélio germinativo, seguido internamente por uma camada de tecido conjuntivo denso rico em fibras colágenas, a túnica albugínea. Abaixo desta, encontram-se os folículos ovarianos primordiais. Os folículos ovarianos em desenvolvimento se deslocam para a região mais profunda do córtex, o estroma, onde também podem ser encontrados os corpos lúteos, hemorrágicos e os *corpus albicans* (**Figura 1**) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011). A medula ovariana é constituída de tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos distribuídos irregularmente, composta por nervos extensos e rico leito vascular, onde esta vascularização sofre adaptação do suprimento sanguíneo de acordo com o período ovulatório (HAFEZ & HAFEZ, 2004a).

**Figura 1 - Ilustração de ovário mamífero.**



Fonte: Adaptado de SILVA, 2012.

## 2.2. Oogênese

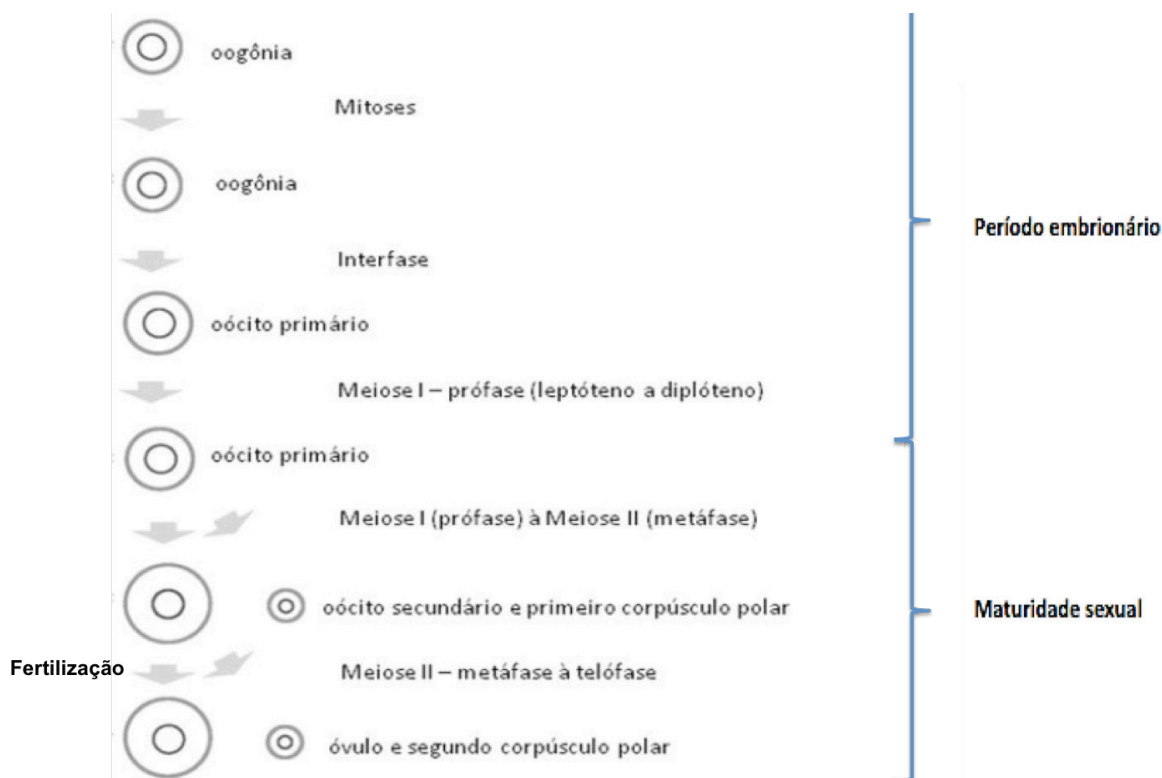
A oogênese é o processo de diferenciação e formação do gameta feminino onde este possa ser capaz de sofrer fertilização e suportar o desenvolvimento embrionário inicial; esta gametogênese têm início e estaciona durante a vida embrionária, sendo finalizada após a fecundação (CARROLL *et al.*, 1996). Nos mamíferos, os oócitos se desenvolvem a partir de células germinativas primordiais (PGCs) (DRUMMOND, 2006). Em suínos, o processo de oogênese se inicia aproximadamente no 13º dia de desenvolvimento embrionário, quando as células germinativas sofrem grande atividade mitótica, sendo: no 20º dia da vida fetal, estas células encontram-se por volta de 5.000 em número; no 33º dia ocorre a diferenciação morfológica do ovário; o processo meiótico das células germinativas inicia-se por volta do 40º dia, ocorrendo redução do processo mitótico; no 44º ocorre a formação das cristas genitais no ovário e migração das PGCs para estas através de estímulos quimiotáticos produzidos pelo cume genital, sendo as células partir desta migração, denominadas oogônias; aproximadamente no 50º dia o processo mitótico finaliza, resultando por volta de 5.000.000 de células totais (ANDERSON, 2004; LIU *et al.*, 2006; PONTELO, 2015; SMITZ & CORTVRINDT, 2002).

Quando as divisões mitóticas das oogônias cessam, esta população de células entra em prófase meiótica (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012). A gestação suína tem duração média de 114 dias, porém próximo ao período do nascimento, devido à substâncias inibidoras da meiose secretadas pelas células foliculares, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica, em diplóteno I, onde a célula passa a ser denominada ovócito primário - oócito I - e permanece nesta fase até a fêmea atingir a maturidade sexual, período em que o animal está apto para atividade reprodutiva (em suínos ocorre aproximadamente no 5<sup>o</sup> ou 6<sup>o</sup> mês de vida) (ALVARENGA, *et al.*, 2011; SUH *et al.*, 2002).

Na maturidade, a cada ciclo, picos de hormônios estereidogênicos – luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) – permitem a retomada da meiose (CANIPARI, 2000). Com a progressão da meiose, a célula se divide, originando duas células: o primeiro corpúsculo polar (CP1) e o oócito secundário – oócito II (BUTTIONE *et al.*, 1990). A formação do CP1 é fundamental no processo de maturação oocitária, sendo sua visualização um importante indicativo de maturação (PICITNATO *et al.*, 2008). Na última fase de maturação do gameta, este oócito, induzido pelo aumento de gonadotrofinas pré-ovulatórias, progride até ao estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção meiótica seguida de ovulação (SUTTON *et al.*, 2003). Neste período, os cromossomos são descondensados e o núcleo passa a ser denominado vesícula germinal ou germinativa (VG) (SMITZ & CORTVRINDT, 2002). A retomada e finalização da meiose ocorre com a fertilização, onde ocorre a extrusão dos grânulos corticais (bloqueiam a poliespermia), expulsão do segundo corpúsculo polar (CP2) e a formação do embrião (**Figura 2**) (FERNANDES *et al.*, 2012; CARROLL, *et al.*, 1996). Ao contrário do oócito, os corpúsculos polares sofrem atresia (JIAO & WOODRUFF, 2013).

Em suínos, o processo de oogênese se diferencia da maioria dos mamíferos por apresentar síntese pré-meioótica de DNA e transformação de oogônia em oócito durante a vida pós-natal, onde quase todas as células que iniciaram a meiose no 40<sup>o</sup> dia do desenvolvimento embrionário e estacionaram no 50<sup>o</sup> dia, permanecem nesse estágio por volta do 20<sup>o</sup> dia após o nascimento (ANDERSON, 2004).

**Figura 2 - Esquematisação do processo de oogênese em mamíferos.**



Fonte: Adaptado de MONTANARI, 2013.

Todo o processo de maturação do oócito é resultado de um período de crescimento desta célula dentro do folículo em desenvolvimento, a foliculogênese; é através de uma prolongada fase que o oócito, de uma forma altamente coordenada, adquire o aparato celular necessário para suportar o desenvolvimento embrionário (SUTTON *et al.*, 2003).

### 2.3. Desenvolvimento folicular

A foliculogênese em espécies mamíferas é um processo altamente seletivo, onde uma pequena proporção de folículos sobrevive à apoptose (morte celular programada) (DRIANCOURT & THUEL, 1998). Inicia-se durante o desenvolvimento fetal (em suínos, aproximadamente no 56<sup>o</sup> dia da gestação) tendo continuidade ao longo da vida adulta (PONTELO, 2015). É resultado de um processo complexo e delicado de interações celulares culminando em um folículo maduro capaz de liberar um oócito fertilizável (**Figura 3**) (KANG, 2003). O folículo ovariano consiste de um oócito envolvido por uma ou mais camadas de células somáticas, denominadas células foliculares ou da granulosa e células tecais (MAGOFFIN, 2005).

As células mesenquimais do ovário sofrem uma transição, segregando uma membrana basal exterior, diferenciando-se em células da granulosa e germinativas primitivas (BUKOVSKY *et al.*, 2005; SMITZ & CORTVRINDT, 2002). As células da granulosa possuem junções GAP comunicantes essenciais para o desenvolvimento do oócito (BUCCIONE, *et al.*, 1990). A granulosa é responsável por enviar, através das microvilosidades, sinais, fatores de crescimento e nutrientes ao gameta para que este se desenvolva (AERT & BOLS, 2010). Porém, esta comunicação entre o oócito e as células somáticas é bidirecional, ao mesmo tempo em que os oócitos recebem seus componentes, estes controlam a proliferação e diferenciação das células da granulosa, através de expansões de suas membranas plasmáticas; sendo assim, ambos possuem papéis importantes no desenvolvimento folicular ovariano, ou seja à medida que o gameta cresce e se desenvolve, as células somáticas se diferenciam (LIU *et al.*, 2006). Já as células da teca são células associadas aos folículos, com função endócrina, desempenhando um papel essencial na produção de andrógenos para a biossíntese de estrógeno ovariano (MAGOFFIN, 2005).

Folículos primordiais dão origem a folículos primários, que se transformam em folículos secundários (pré-antrais), em seguida, folículos terciários (antrais) e, finalmente, folículos de Graaf (pré-ovulatórios), em uma série regulada por hormônios e fatores de crescimento locais (DRUMMOND, 2006). O período do desenvolvimento folicular varia entre as espécies. Em roedores, por exemplo, a reserva folicular é estabelecida no momento do nascimento, enquanto que em primatas e espécies de animais domesticados, como suínos, o estoque de folículos primordiais se desenvolve durante a transição da vida (AERT & BOLS, 2010; ANDERSON, 2004).

**2.3.1 Folículos primordiais:** formados durante a vida embrionária, constituídos, cada um, por um oócito primário envolto por uma única camada de células foliculares achatadas, também conhecidas como pré-granulosa (GRIFFIN, *et al.*, 2006). Estes folículos correspondem a 90% dos folículos totais presentes no ovário (SMITZ & CORTVRINDT, 2002). Após o término da multiplicação, as células entram em um período de quiescência em que o crescimento será retomado apenas na maturidade sexual, onde um pequeno grupo de folículos inicia o crescimento folicular (AERT & BOLS, 2010).

### **2.3.2. Folículos em desenvolvimento**

**2.3.2.1. Folículo primário:** O crescimento do folículo representa uma série de transformações moleculares e subcelulares, onde ocorre o aumento do volume nuclear do oócito, o aumento do número de mitocôndrias, crescimento do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, além da transição das células da granulosa formando uma camada única de células cuboides (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011). À medida que se inicia este crescimento folicular, as glicoproteínas que formam a zona pelúcida começam a ser sintetizadas; esta é uma matriz homogênea, acidófila e acelular, localizada entre o oócito e as células foliculares (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012).

**2.3.2.2. Folículo secundário:** Devido aos estrogênios, em associação com as gonadotrofinas, as células foliculares se dividem formando duas ou mais camadas que passam a constituir a granulosa (DRUMMOND, 2006). Neste estágio, a zona pelúcida é visível ao redor do oócito. O estroma ovariano ao redor do folículo se diferencia em células tecais e ocorre a formação de uma membrana basal no pólo basal das células da granulosa e estas células tecais (PARROT & SKINNER, 2000). As células foliculares aumentam a expressão de receptor para o hormônio folículo estimulante (FSH), o qual é essencial para dar continuidade ao desenvolvimento do folículo, estimulando o aumento da atividade mitótica da granulosa e a formação do fluido folicular; o FSH também é responsável por promover o aumento de receptores para o hormônio luteinizante (LH), como por exemplo em porcas, esses novos receptores aumentam de 300 em folículos pré-antrais para 10.000 em folículos pré-ovulatórios (HAFEZ & HAFEZ, 2004b).

**2.3.2.3. Folículo terciário:** Durante o desenvolvimento folicular, devido ao aumento da vascularização e intensa atividade mitótica das células da granulosa, cavidades contendo fluido folicular (transudato de soro sanguíneo modificado pela atividade metabólica da granulosa, contendo esteroides e glicoproteínas), denominadas antro folicular, passam a ser identificadas (VAN DER HURK & ZAO, 2005). A partir deste fato, os folículos passam a ser nomeados folículos antrais. As células tecais se dividem em duas: a teca interna, responsável pela síntese de estrogênio, e a teca externa, semelhantes às células do estroma ovariano (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012). Devido à presença e aumento do antro folicular, maior parte das células da granulosa se deslocam para a periferia.

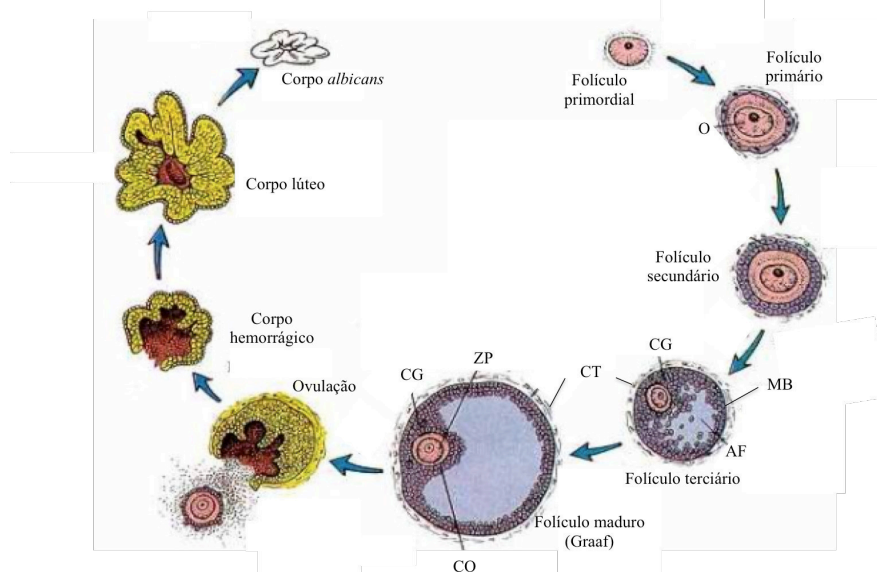
**2.3.2.4. Folículo maduro ou de Graaf:** Também denominado de pré-ovulatório, este folículo é caracterizado por um oócito rodeado de algumas células foliculares, o *cumulus oophorus*, também classificadas como células do cumulus (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012). Estas



possuem algumas diferenças com o restante das células foliculares, dentre elas a redução na quantidade de receptores para LH, capacidade reduzida na produção de esteroides, maior quantidade de mRNA que codifica a inibina (possui atividade supressora de FSH), maior atividade proliferativa e menor sensibilidade à atresia (DRIANCOURT & THUEL, 1998). Neste estágio pré-ovulatório, as divisões mitóticas das células da granulosa chegam ao máximo da divisão e o fluido folicular começa a conter concentrações elevadas de substâncias moduladoras ou reguladoras, dentre elas o 17beta-estradiol e progesterona; o líquido antral também passa a acumular e secretar uma série de compostos não-esteróides como fator inibidor da maturação (OMI), inibidor da luteinização, relaxina e inibina (HAFEZ *et al.*, 2004).

**2.3.2.5. Corpo lúteo:** Originado após a ovulação pelas células do folículo (células da granulosa e tecais) que permaneceram no ovário (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012). É uma glândula produtora de progesterona (hormônio cuja secreção contínua é essencial para o início e manutenção da gestação); quando a fêmea encontra-se gestante, a presença do embrião no útero ocasiona a manutenção do corpo lúteo; caso contrário, há regressão (luteólise) da glândula sob ação da prostaglandina presente no endométrio (ARRUDA *et al.*, 2001). Com a regressão, as células degeneram e formam uma cicatriz, o corpo albicans; O período de atividade do corpo lúteo (classificado como fase luteínica) em suínos dura aproximadamente 16 a 17 dias (HAFEZ & HAFEZ, 2004b; ANDERSON, 2004).

**Figura 3 - Estágios de crescimento folicular: 1) folículos primordiais; 2) folículo primário; 3) folículo secundário; 4) folículo terciário; 5) folículo maduro ou de Graaf.** AF = antro folicular; CG = células da granulosa; CO = *cumulus oophorus*; CT = células da teca; MB = membrana basal; O = oócito;; ZP = zona pelúcida.



Fonte: Adaptado de <<http://www.escolademorfologia.uff.br>>

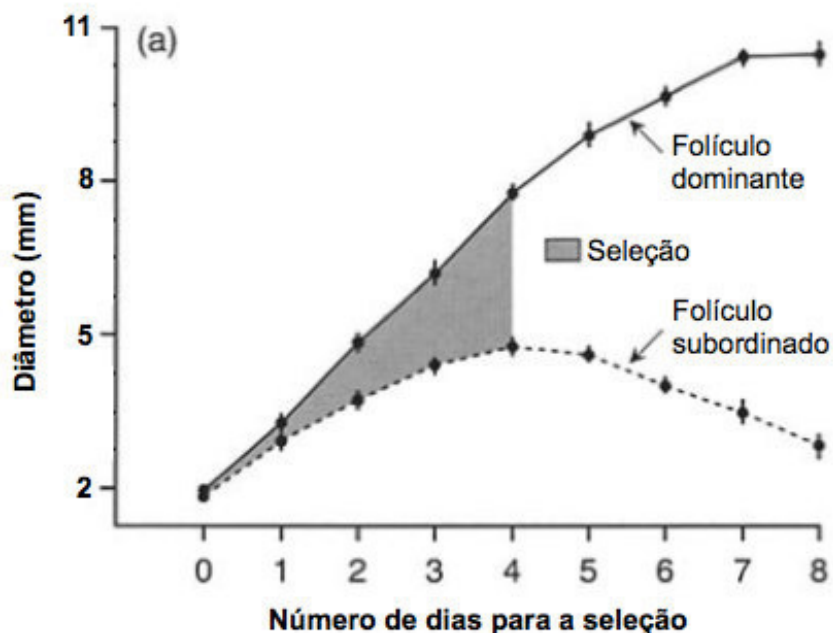
Todo esse processo de desenvolvimento folicular e sobrevivência depende de sinalizações autócrina e parácrina envolvendo fatores de crescimento da célula da granulosa, células da teca, estroma, células intesticiais e oócitos (HUSSEIN, 2005).

#### **2.4. Onda folicular e a ovulação**

Na maturidade sexual, o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal promove a liberação pulsátil de FHS e LH pela hipófise, culminando no desenvolvimento cíclico de folículos antrais e início da ovulação (GOUGEON, 2003). Este desenvolvimento é caracterizado pela onda folicular, uma fase onde ocorre o crescimento, recrutamento, seleção e dominância de um grupo de folículos antrais sendo, esta formação de um folículo pré-ovulatório, um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo (DRUMMOND, 2006). Estas fases foram detectadas em bovinos, ovinos e equinos e durante o período pré-púbere de suínos (DRIANCOURT, 2001).

Durante um único ciclo estral, que em porcas dura aproximadamente 21 dias (variando entre 19 e 23 dias), ocorrem em média 3 a 4 ondas foliculares, sendo o folículo pré-ovulatório derivado da última onda (GRADELA *et al.*, 2000). O folículo selecionado para o crescimento (que se tornará o pré-ovulatório) é denominado dominante, enquanto os outros, subordinados; é no momento da seleção que o perfil de crescimento do folículo dominante começa a divergir (**Gráfico 1**), continuando seu desenvolvimento, enquanto que os folículos subordinados entram em atresia (GINTHER *et al.*, 1996). O folículo dominante, ao atingir aproximadamente 90% da divisão máxima da granulosa, passa a secretar inibina, suprimindo o desenvolvimento dos demais folículos (FORTUNE *et al.*, 2001). A manutenção e regressão do folículo dominante estão associadas à alterações nos níveis de progesterona e LH (HAFEZ & HAFEZ, 2004b).

Gráfico 1 - Gráfico demonstrando a relação do diâmetro folicular durante os dias de recrutamento.



Fonte: Adaptado de GINTHER *et al.*, 1996.

As células da granulosa de folículos dominantes estacionam a mitose em resposta ao aumento dos níveis de LH, iniciando assim o processo final de diferenciação folicular e promovendo a ovulação; o folículo dominante passa por três modificações principais durante o processo ovulatório: maturação citoplasmática e nuclear do oócito, separação das células do cumulus do restante da granulosa e afinamento e ruptura da membrana celular externa (este último devido ao aumento dos níveis de LH); para que estes eventos ocorram é necessária a ação de prostaglandinas, que estimulam contrações ovarianas e ativam os fibroblastos da teca para liberarem enzimas proteolíticas, digerindo assim a parede folicular e a membrana basal (esteóides, principalmente progesterona, também estão envolvidos nesse processo) (HAFEZ & HAFEZ, 2004b).

## 2.5. Atresia folicular

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população ovariana; porém quase 100% destes sofrem processos degenerativos durante a vida reprodutiva (AARON *et al.*, 2008). Apesar de ocasionar a morte de muitas células, é um processo essencial para a homeostase da função ovariana em mamíferos, garantindo a seleção do folículo dominante e eliminando folículos em excesso, minimizando assim a superovulação, além de assegurar o desenvolvimento de poucas células, porém de boa qualidade; a atresia também é responsável

pela degeneração do corpo lúteo, essencial para regular a esteroidogênese ovariana (AMSTERDAM *et al.*, 2003).

Dentre os mecanismos moleculares responsáveis pela atresia folicular estão a apoptose (AARON *et al.*, 2008), sendo também descrito a seguir formas de atresia folicular por necrose.

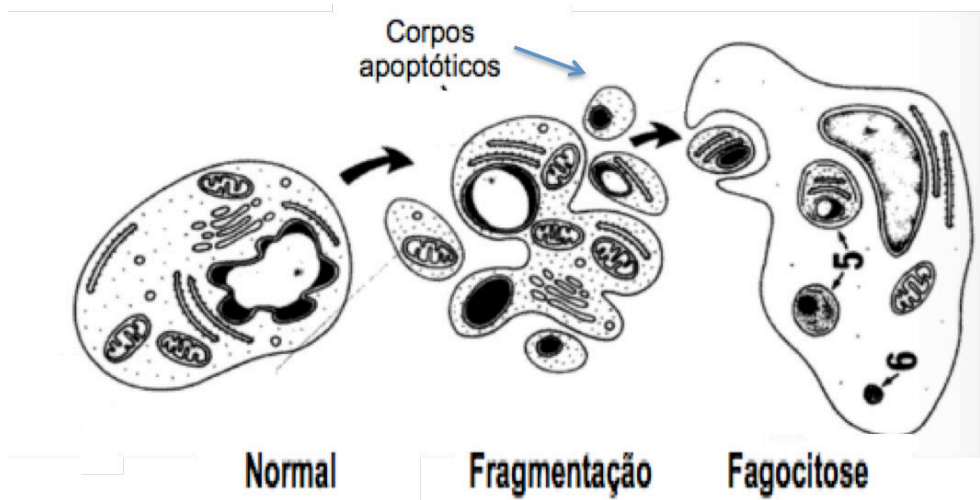
### **2.5.1. Apoptose**

Também definida como morte celular programada, a apoptose é um processo geneticamente determinado ocasionado pela parada de atividade bioquímica celular (ZEISS, 2003). Na célula apoptótica ocorre um desencadeamento de eventos: desidratação citoplasmática, condensação do material genético, proteólise da membrana nuclear (ocasionando desintegração da carioteca e fragmentação nuclear); os fragmentos nucleares derivados da apoptose são envolvidos pela membrana plasmática, dando origem aos corpos apoptóticos, onde são fagocitados, porém sem aparecimento de processo inflamatório (**Figura 4**) (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Este evento ocorre quando há um dano irreparável onde o DNA ou proteínas celulares são lesadas (ocasionando um "suicídio celular") e é ativado ou suprimido por uma variedade de vias de sinalização e por proteínas celulares anti-apoptóticas expressas em folículos pré-ovulatórios (ROBBINS & COTRAN, 2010; JOHNSON, 2003). As características histológicas apoptóticas incluem: citoplasma vacuolizado, cromatina condensada, irregularidade da membrana nuclear e presença de corpos apoptóticos, além de células eosinofílicas; este evento é observado nos folículos ovarianos durante toda a vida da fêmea. Durante a vida fetal, este processo ocorre em oócitos (ocasionando retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, desencadeando assim eliminação irreversível destes folículos), porém na vida adulta as células foliculares da granulosa e da teca de folículos secundários e antrais é que sofrem a morte programada, pois ainda não estão diferenciadas, ao contrário do oócito; estresse oxidativo, danos no DNA, citocinas, deficiência de fatores de sobrevivência celular e proteínas virais são fatores que podem desencadear a apoptose (HUSSEIN, 2005; MORITA & TILLY, 1999).

Uma das principais proteínas responsáveis pelo início do processo apoptótico são as caspases (enzimas de proteases de cisteína), sendo geralmente as enzimas ativadas para início do evento, as caspases 8 ou 9; uma vez ativadas, clivam proteínas essenciais para a viabilidade celular (HUSSEIN, 2005; ZEISS, 2003). Existem dois padrões moleculares que podem ativar as caspases: a primeira via se dá através dos receptores de morte que são receptores na membrana

celular que transmitem sinais apoptóticos quando recebem ligantes específicos, como o fator de necrose tumoral (TNF) ou ligante para o receptor do fator de necrose tumoral (Fas) (KAIPIA & HSUEH, 1997). Já a segunda via é mediada pelas mitocôndrias, através de estresse intrínseco, onde esta libera o citocromo c para o citosol que impede a formação de trifosfato de adenosina (ATP) (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

**Figura 4 - Ilustração dos estágios da morte celular programada.**



**Fonte:** Adaptado de KERR, 1993.

### 2.5.2. Necrose

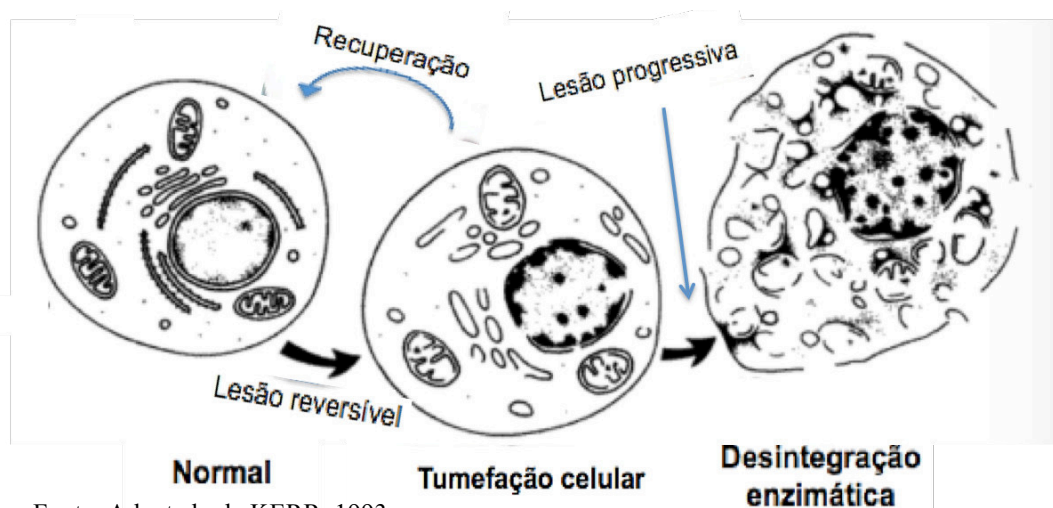
Quando ocorre um dano na membrana celular de maneira acentuada, as enzimas lisossômicas extravasam para o citoplasma digerindo a célula, assim o conteúdo celular é desintegrado; ao contrário da apoptose (que auxilia funções normais do organismo), a necrose é sempre um processo patológico; quando ocorre uma falha na bomba de íons dependente de energia da membrana plasmática, a célula perde a capacidade de manter a homeostasia iônica e líquida, sendo esse tipo de lesão, também denominado alteração hidrópica ou degeneração vacuolar, reversível; porém, quando a célula perde a capacidade de manter a integridade da membrana, acaba sofrendo necrose (**Figura 5**); este processo desencadeia reação inflamatória (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Assim como a apoptose, a necrose também possui mecanismo dependente das caspases, sendo também um dos mecanismos de ação a deficiência de ATP (liberação de citocromo c pelas mitocôndrias, ocasionando uma perturbação no transporte de elétrons) (ZEISS, 2003). Graças à perda de RNA citoplasmático e às proteínas citoplasmáticas

desnaturadas, a célula necrótica apresenta eosinofilia aumentada; as alterações no núcleo apresentam três padrões: a cariólise (degradação enzimática do DNA), picnose (retração nuclear e aumento de basofilia – também presente na apoptose) e cariorrexe (fragmentação nuclear) (ROBBINS & COTRAN, 2010).

A compartimentalização de cálcio intracelular pela mitocôndria é essencial para manter a homeostase, porém quando o tecido encontra-se anóxico, esse evento é interrompido, causando assim a morte celular (GLEVA *et al.*, 1990), ou seja, a isquemia pode ser uma das principais causas da degeneração folicular.

**Figura 5 - Ilustração dos estágios celular por necrose.**



Fonte: Adaptado de KERR, 1993.

## 2.6. Preservação de ovários no transporte

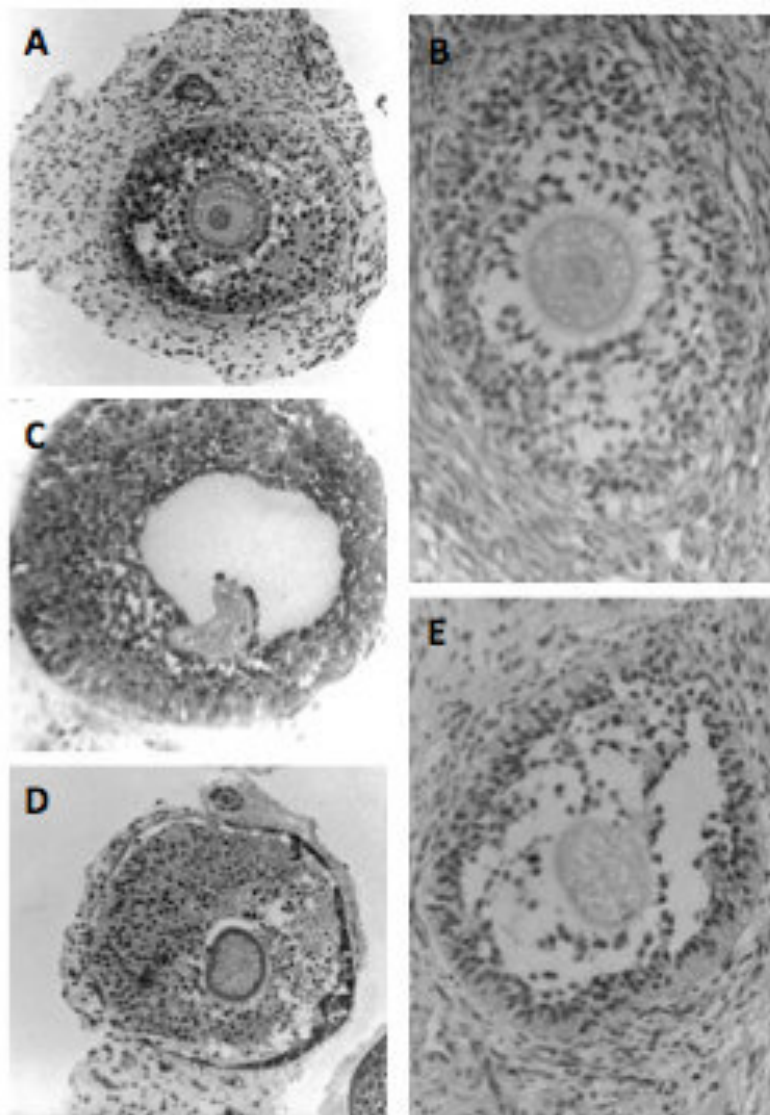
A preservação das gônadas durante o transporte possui larga importância, principalmente quando o doador de ovário está distante de laboratórios especializados (LUCCI *et al.*, 2007). Por este motivo, um protocolo adequado deve ser adotado de forma a minimizar os danos celulares e teciduais. Alguns fatores essenciais para a sobrevivência celular devem ser levados em consideração, como a escolha do meio de transporte, a temperatura e o tempo de preservação. O transporte e o período de armazenamento dos ovários estão entre os fatores que afetam a maturação oocitária (SUTTON *et al.*, 2003). Em laboratórios que possuem maior distância do ponto de coleta, o ideal seria o resfriamento, pois a redução da temperatura tecidual proporciona uma diminuição do metabolismo folicular, conseqüentemente atrasando o processo denerativo (ROY & TREACY, 1993).

Oócitos de porca possuem alto teor de lipídeos (HAFEZ & HAFEZ, 2004b), por este motivo, possuem alta sensibilidade ao arrefecimento, especialmente abaixo de 15°C (Didion *et al.*, 1990). Porém, Lucci e colaboradores (2007) utilizaram, para o transporte de ovários suínos, solução salina a 4 ou 20° C em diferentes períodos de tempo (6, 12 e 18 horas) e verificaram que as temperaturas de 4° C durante 18 horas, ou 20° C durante 6 horas, não afetam a morfologia dos folículos em crescimento (LUCCI *et al.*, 2007). Em outro estudo foi visto que a temperatura fisiológica, aproximadamente 39°C, associados à anoxia em estudos *in vitro*, leva à degeneração folicular (CELESTINO *et al.*, 2007). A privação de oxigênio resulta em uma mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico, liberando assim ácido láctico e acumulando-o no citosol, conseqüentemente, ocasionando redução do pH citoplasmático (WONGSRIKEAO *et al.*, 2005).

## **2.7. Análise histológica da morfologia folicular**

Alguns trabalhos, dentre eles Carvalho e colaboradores (2001), Lucci e colaboradores (2007) e Celestino e colaboradores (2007), utilizaram formas semelhantes de análise histológica da morfologia folicular, considerando como folículo em crescimento normal aquele que apresentava oócitos saudáveis e intactos (**Figuras 6A e 6B**), com núcleo redondo, rodeado por células da granulosa bem organizadas sem núcleos picnóticos. Já os folículos degenerados (**Figuras 6C, 6D e 6E**) foram classificados por estes autores de acordo com a presença de qualquer um desses aspectos: núcleo oocitário condensado, oócito encolhido, ooplasma não homogêneo, corpos picnóticos, células foliculares desorganizadas ou em baixa densidade (CARVALHO *et al.*, 2001; LUCCI *et al.*, 2007; CELESTINO *et al.*, 2007).

**Figura 6 - Exemplos de folículos em crescimento anteriormente classificados como normais ou degenerados.** (A e B) Folículos morfologicamente normais (observar gotículas de lipídeos no ooplasma em B). (C, D e E) Folículos em crescimento degenerativo. C) Oócito deformado com citoplasma coagulado. D) Ooplasma coagulado e presença de corpos picnóticos na granulosa E) Células da granulosa desorganizadas com núcleos picnóticos (A, B e C = 400x; D e E = 225x).



Fonte: LUCCI *et al.*, 2007.

A partir das considerações acima, percebe-se que a manutenção da viabilidade dos folículos próximos do processo ovulatório, depende de condições ambientais favoráveis que preservem sua morfofisiologia e portanto, o processo de fecundação possa ser assegurado.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Este estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade dos folículos ovarianos de suínos sob diferentes temperaturas e tempos de conservação visando obter melhorias nas condições de transporte.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Descrever os folículos ovarianos com ênfase nos folículos antrais
- Relacionar diferentes temperaturas (4 e 35,5 °C) e tempos de acondicionamento (2, 16 e 24 horas) à viabilidade dos folículos antrais.
- Identificar a condição histológica em que os folículos se tornariam viáveis para técnicas reprodutivas.

### 4. METODOLOGIA

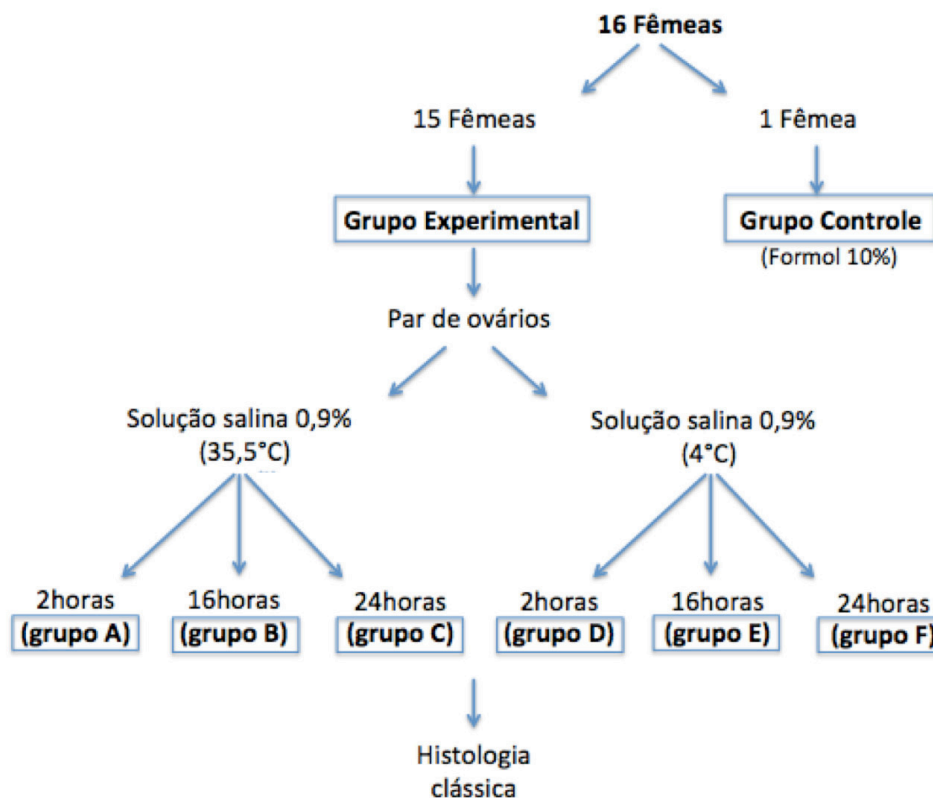
#### 4.1. Origem, coleta e transporte dos ovários

Ovários suínos da raça Large White foram coletados em abatedouro local. Destes foram retirados os tecidos circundantes e posteriormente lavados com solução salina 0,9%. Ainda no abatedouro, com o auxílio de um paquímetro, as gônadas foram medidas em largura e comprimento.

Para o grupo controle, os ovários de uma das fêmeas foram imediatamente fixados em formaldeído tamponado a 10% por 24 horas. Já no grupo experimental, cada fêmea tinha seu par de ovários imerso em solução salina 0,9% suplementada com pentabiótico (Zoetis,  $2,4 \times 10^5$  UI) armazenadas em botijões térmicos e conservadas em duas diferentes temperaturas: um a 35,5 °C e outro a 4 °C. No laboratório, os órgãos foram mantidos frescos contendo o mesmo meio citado anteriormente com temperaturas conservadas em banho-maria a 35,5 °C e geladeira a 4 °C. Ainda no grupo experimental, três períodos de conservação foram testados: 2, 16 e 24 horas, sendo 5 para cada tratamento, resultando em seis grupos experimentais (**Figura 7**). Após

a retirada das soluções aquecidas e resfriadas, os ovários foram imersos em formol 10% também por 24 horas para posterior realização de rotina histológica citada a seguir.

**Figura 7 - Fluxograma do protocolo experimental de conservação dos ovários suínos.**

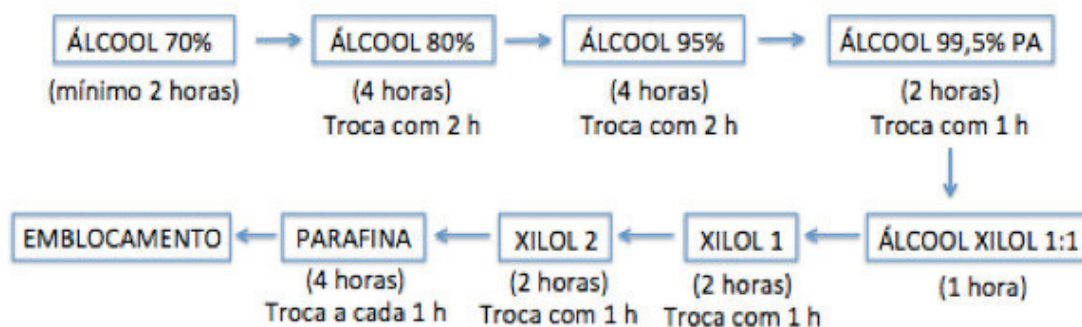


Fonte: autoral.

## 4.2. Procedimentos histológicos

Após a fixação em formol 10%, todas as gônadas foram lavadas em água destilada e imersas em álcool 70% onde permaneceram, no mínimo, durante uma hora. Para a bateria de desidratação os ovários foram transferidos para álcool 80% durante duas horas (com troca de álcool a cada hora), posteriormente 95% e 99,5% também pelo período de duas horas cada (com o mesmo procedimento citado anteriormente). Após a desidratação, os tecidos foram imersos em álcool-Xilol (1:1) durante uma hora para dar início ao processo de diafanização, seguido por Xilol 1 e Xilol 2 com duas horas cada e troca de meio a cada hora. Para a impregnação, os ovários foram mantidos em parafina a 60 °C durante quatro horas, sendo trocados de parafina a cada hora para uma melhor infiltração tecidual. Posteriormente as gônadas foram emblocadas em parafina para realização de cortes histológicos (**Figura 8**).

**Figura 8 - Esquematização dos protocolos histológicos de desidratação, diafanização e impregnação dos ovários.**



Fonte: autoral.

Com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2235) cada bloco contendo o fragmento ovariano foi seccionado em série com espessuras de 5µm, sendo as secções coradas com Hematoxilina por 6 minutos, lavadas em água mineral e posteriormente coradas com Tricômico de Gomori.

#### 4.3. Análise da morfologia de folículos antrais

As secções foram examinadas com microscopia de luz (Leica DM 1000 LED) com aumento de 40x, 100x e 200x. Em cada secção foi realizada a contagem máxima de 30 folículos antrais, avaliando a organização das células da granulosa (presença ou ausência de picnose, bem como integridade da membrana basal) e, quando possível, do oócito (presença ou ausência de picnose nuclear ou retração citoplasmática). Foram classificados como folículos normais aqueles com oócitos saudáveis (ausência de retração citoplasmática ou núcleo picnótico) e/ou células da granulosa bem organizadas (aderidas à membrana/lamina basal, com células tecais bem organizadas, com ausência de picnose nuclear).

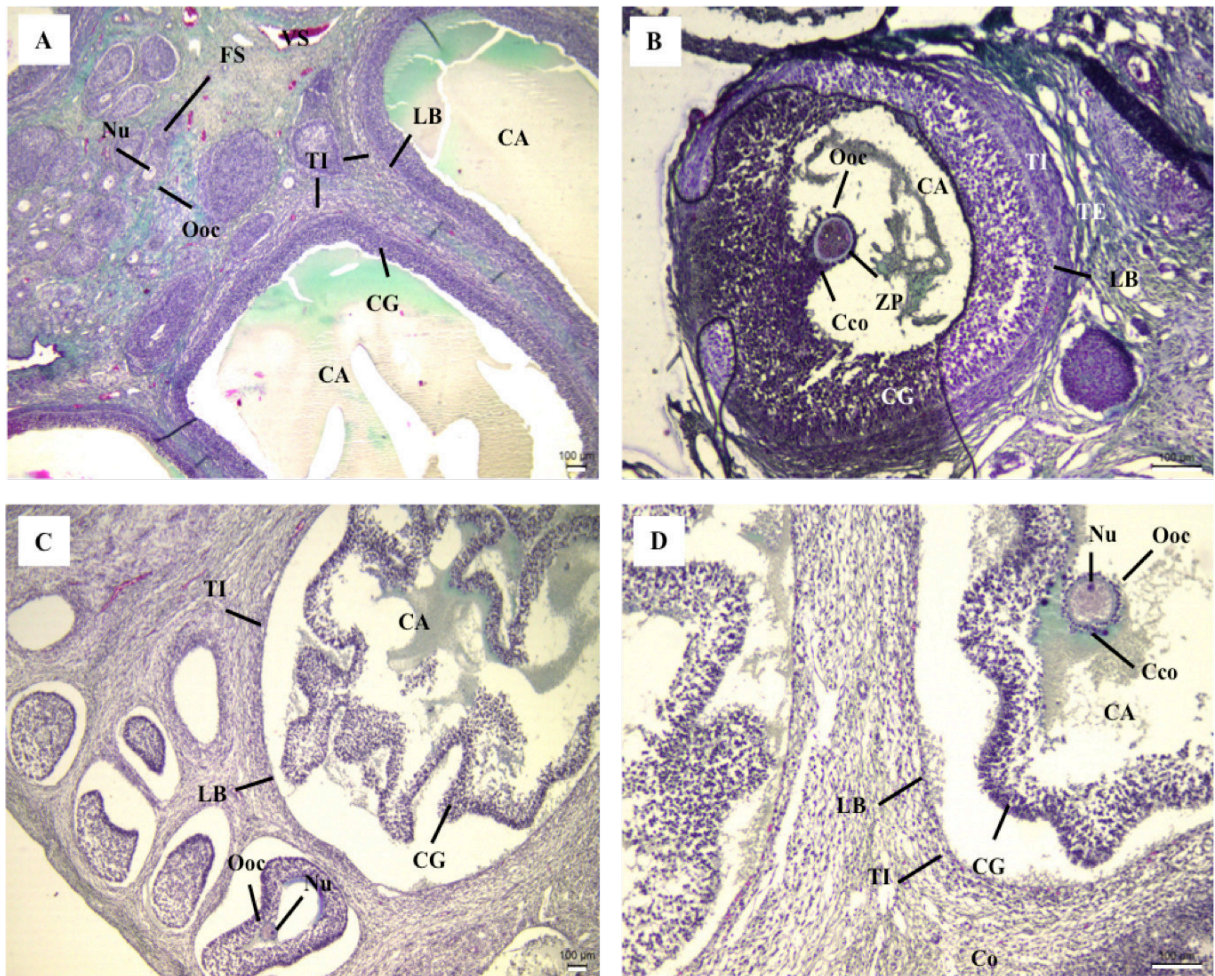
#### 4.4. Análises estatísticas

Para se verificar diferenças entre os tratamentos, foi utilizada a frequência de folículos normais observados em cada ovário. Os dados foram testados para normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Uma vez que os dados não eram normais, utilizou-se o teste de Kruskal Wallis para a comparação entre os tratamentos, com nível de significância ( $p < 0,05$ )

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 32 ovários suínos foram obtidos, sendo a variação de tamanho entre 1,2cm e 2,97cm de comprimento, onde a partir destes, 974 folículos antrais foram analisados (média de  $27,82 \pm 7,02$  de folículos analisados por secção). A porcentagem máxima de folículos normais encontrados em uma secção foi de 90%, sendo em algumas secções não encontrados folículos normais. O teste de Kruskal Wallis mostrou que os números de folículos normais apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ;  $gl = 6$ ). A figura 9 mostra o exemplo de folículos antrais classificados como morfologicamente normais (**Figuras 9A e 9B**) ou degenerados (**Figuras 9C e 9D**).

**Figura 9 - Exemplos de classificação da morfologia folicular.** (A e B) folículos normais - células da granulosa (CG) em grande quantidade, aderidas à lâmina basal (LB), com células da teca interna (TI) e externa (TE) organizadas, sem presença de núcleos (Nu) picnóticos. (C e D) folículos degenerados - células da granulosa reduzidas em número e dispersas no antro folicular (AF) apresentando retração à lâmina basal, com presença de picnose e/ou oócito (Ooc) degenerado apresentando retração e/ou com citoplasma difuso e poucas células do cumulus oophorus (Cco) aderidas à zona pelúcida (ZP). CO = córtex; VS = vaso sanguíneo.

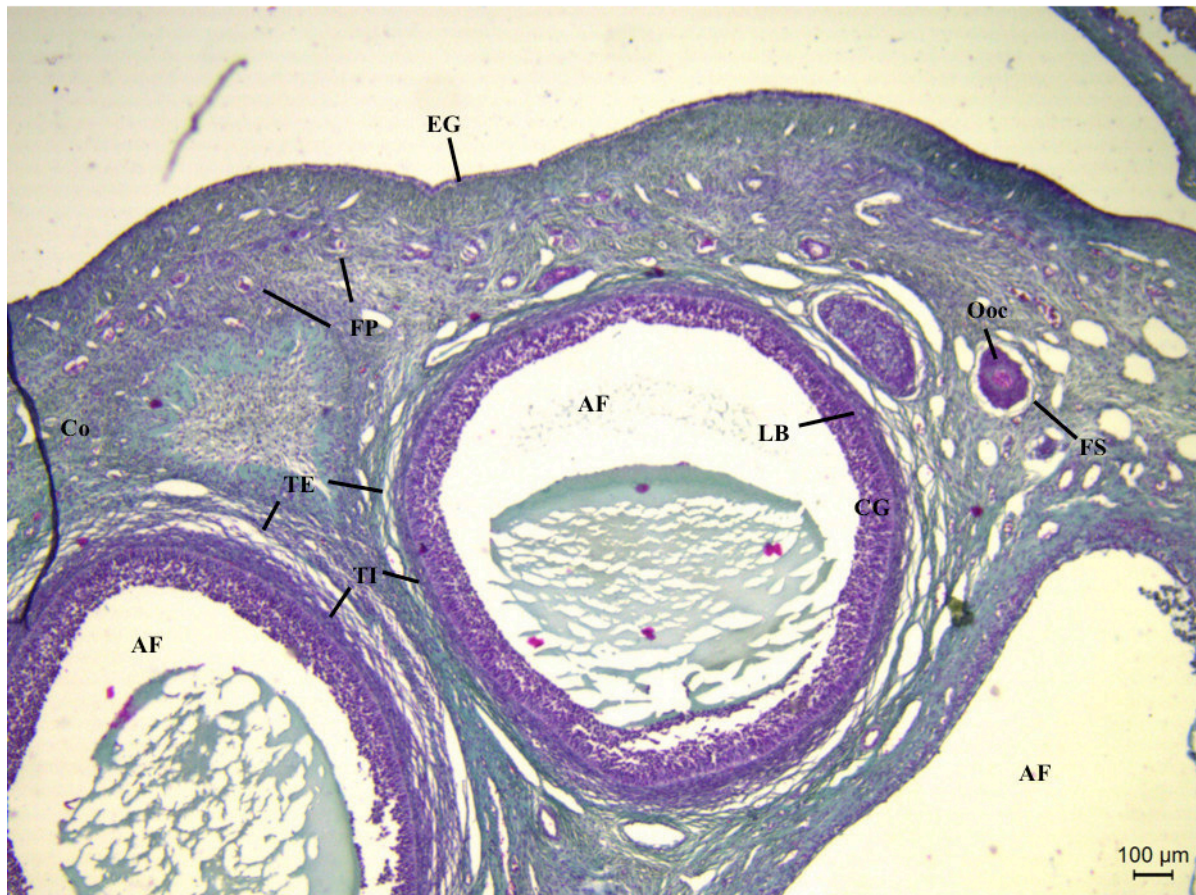


Fonte: autoral.



A análise histológica mostrou que o armazenamento de peças ovarianas a 4 ou 35,5 °C por 2 horas (**Figura 11**) não afetou a frequência de folículos normais em comparação com o controle (**Figura 10**), estando grande parte dos oócitos nestas temperaturas com morfologia normais, sem apresentarem, em sua maioria, retração citoplasmática.

**Figura 10 - Fotomicrografia de tecido ovariano de suínos do grupo controle.** Células da granulosa (CG) aderidas à lâmina basal (LB). Possível diferenciação das células da teca interna (TI) e externa (TE), bem como visualização do epitélio germinativo (EG), folículos primários (FP) e secundário (FS). AF = antro folicular; Co = córtex.

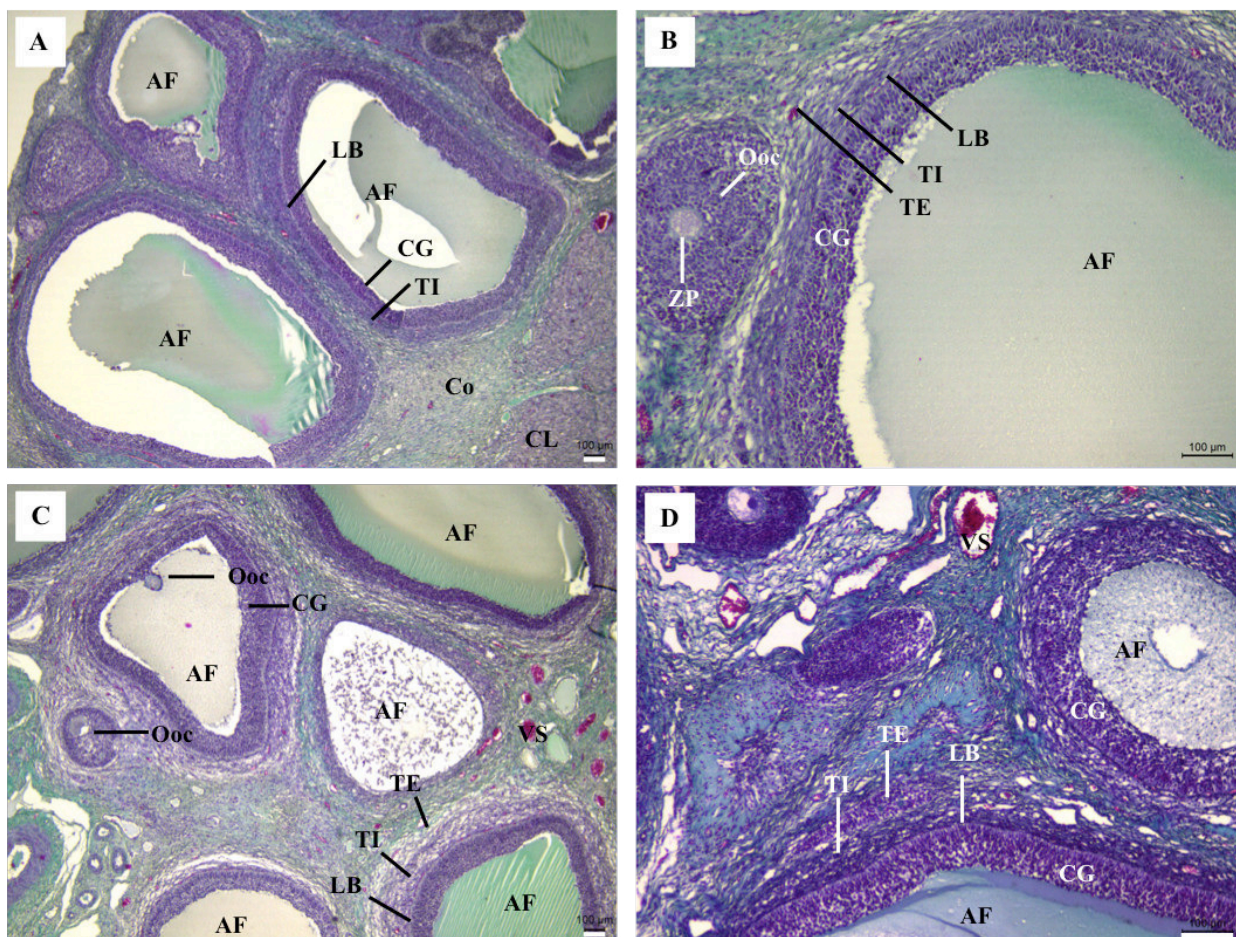


Fonte: autoral.

Na figura 10 pode-se visualizar células da granulosa bem organizadas, aderidas à lâmina basal, visualização das tecas internas e externas, oócitos com morfologia e citoplasmas normais. É possível também a visualização de folículos primordiais, primários, secundários e do epitélio germinativo.



**Figura 11 - Fotomicrografias de tecido ovariano de suínos armazenado em diferentes temperaturas por 2 horas.** (A e B) armazenamento a 4 °C. (C e D) armazenamento a 35,5 °C. Ambos os casos apresentando folículos normais, com células da granulosa (CG) organizadas, com várias camadas, aderidas à lâmina basal (LB) e oócitos (Ooc) normais com citoplasma regular e sem retração. Possível diferenciação das tecas interna (TI) e externa (TE) e visualização da zona pelúcida (ZP). AF = antro folicular; Co = córtex; CL = corpo lúteo; VS = vaso sanguíneo.



Fonte: autoral.

Por outro lado, o armazenamento dos ovários a 35,5 °C durante 16 ou 24 horas reduziu estatisticamente a frequência de folículos morfologicamente normais (**Figura 12**). A frequência destes folículos ovarianos armazenados em ambos tratamentos também foi significativamente inferior ao tecido armazenado à mesma temperatura durante 2 horas. Estes resultados podem ser explicados devido ao fato de que folículos em crescimento apresentam alta atividade mitótica nas células da granulosa (HAFEZ & HAFEZ, 2004b), portanto necessitam de maior quantidade de oxigênio e nutrientes. Longos períodos de armazenamento ocasionam a privação deste oxigênio, consequentemente, com o metabolismo anaeróbico, há o acúmulo de ácido láctico no citosol ocasionando a redução do pH, ou seja, acidificação do meio (WONGSRIKEAO *et al.*, 2005). No entanto, o resfriamento tecidual ocasiona uma redução da

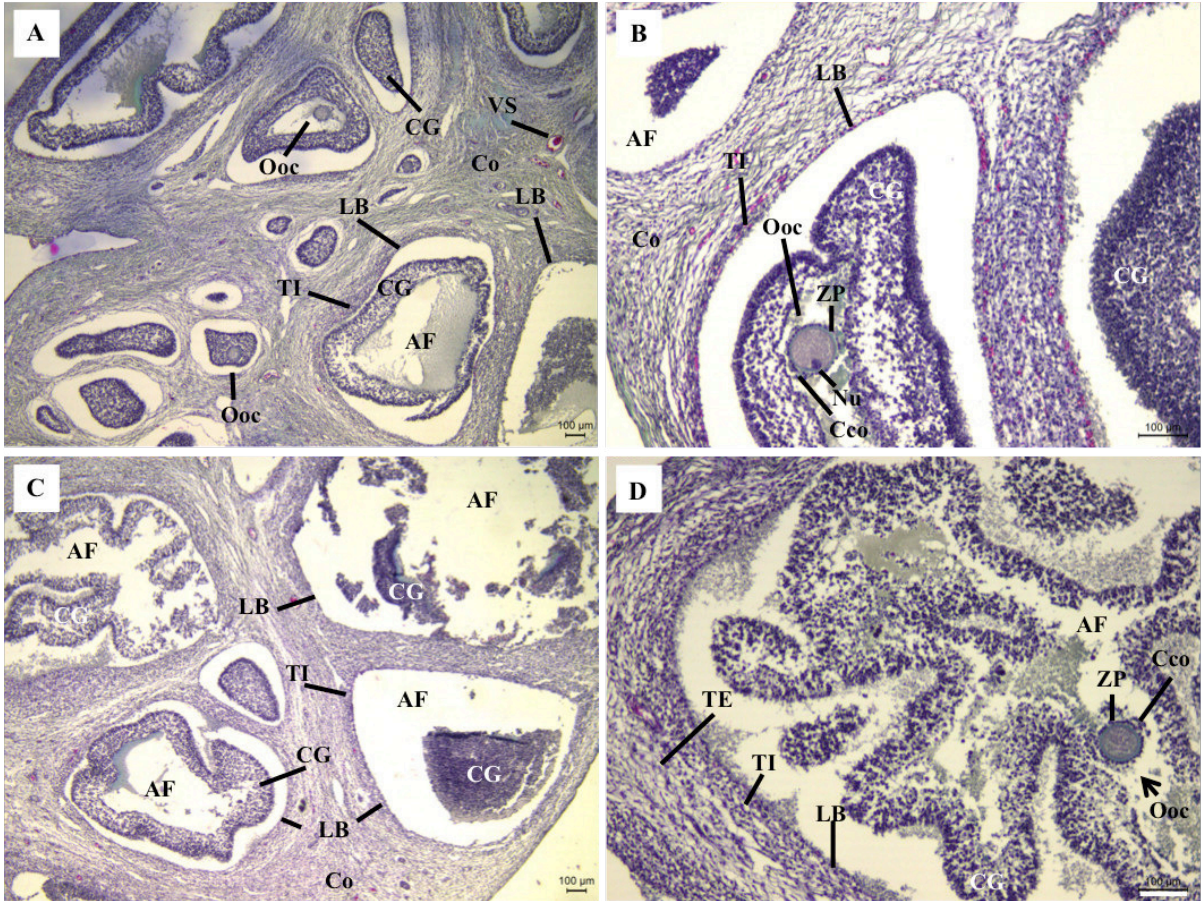
atividade metabólica celular reduzindo o consumo de oxigênio, limitando assim o risco de necrose (FRANCECHINI & FULAN, 2012).

Além disso, a taxa de folículos normais preservados à temperatura de 4 °C (**Figura 13**) evidenciou ser superior à temperatura de 35,5 °C quando os ovários foram armazenados por 16 e 24 horas (**Gráfico 2**), pois esta diminuição da temperatura proporciona a redução do metabolismo folicular (ROY & TREACY, 1993). Estudos sugerem, também, que a hipóxia provoca alterações na permeabilidade da membrana celular, prejudicando os níveis de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> intracelulares que, sendo os principais reguladores da osmolaridade, podem levar ao aumento dos níveis de água, conseqüentemente, o aumento do volume celular ocasionando sua degeneração (EVORA *et al.*, 1999) fato que pode ter ocorrido nos tratamentos de 16 e 24 horas a 35,5 °C. Estudos em microscopia eletrônica poderiam evidenciar as modificações das organelas em função do acúmulo de água intracelulares.

Apesar da frequência de folículos normais ser maior nos tratamentos de 16 e 24 horas a 4 °C, grande parte dos folículos que se encontravam degenerados apresentavam oócitos retraídos (**Figura 13A, seta**), fato que ocorreu com menor visualização nos tratamentos a 35,5 °C dos mesmos períodos, que apesar de apresentar grande número de folículos danificados, com células da granulosa extremamente retraídas da lâmina basal e células do *cumulus oophorus* escassas, os oócitos em si apresentavam, em sua maioria, morfologia normal. Este fato pode ser explicado devido à grande presença de gotículas de lipídeos associadas ao citoesqueleto nos oócitos suínos (HAFEZ & HAFEZ, 2004b) ocasionando alta sensibilidade ao arrefecimento (Didion *et al.*, 1990), pois a redução da temperatura ocasiona a alteração da morfologia, estrutura e distribuição celular destas gotículas, conseqüentemente ocasionando a ruptura do citoesqueleto (KIM *et al.*, 2001). Também existe a circunstância de que a eficácia do resfriamento do oócito depende da sua fase de desenvolvimento (FERREIRA, *et al.*, 2001). A preservação resfriada de oócitos imaturos tende a obter maior sucesso, pois em oócitos maduros esta temperatura resulta na despolimerização da tubulina, principal proteína responsável pela organização dos microtúbulos dos eixos meióticos (MOOR & CROSBY, 1985).



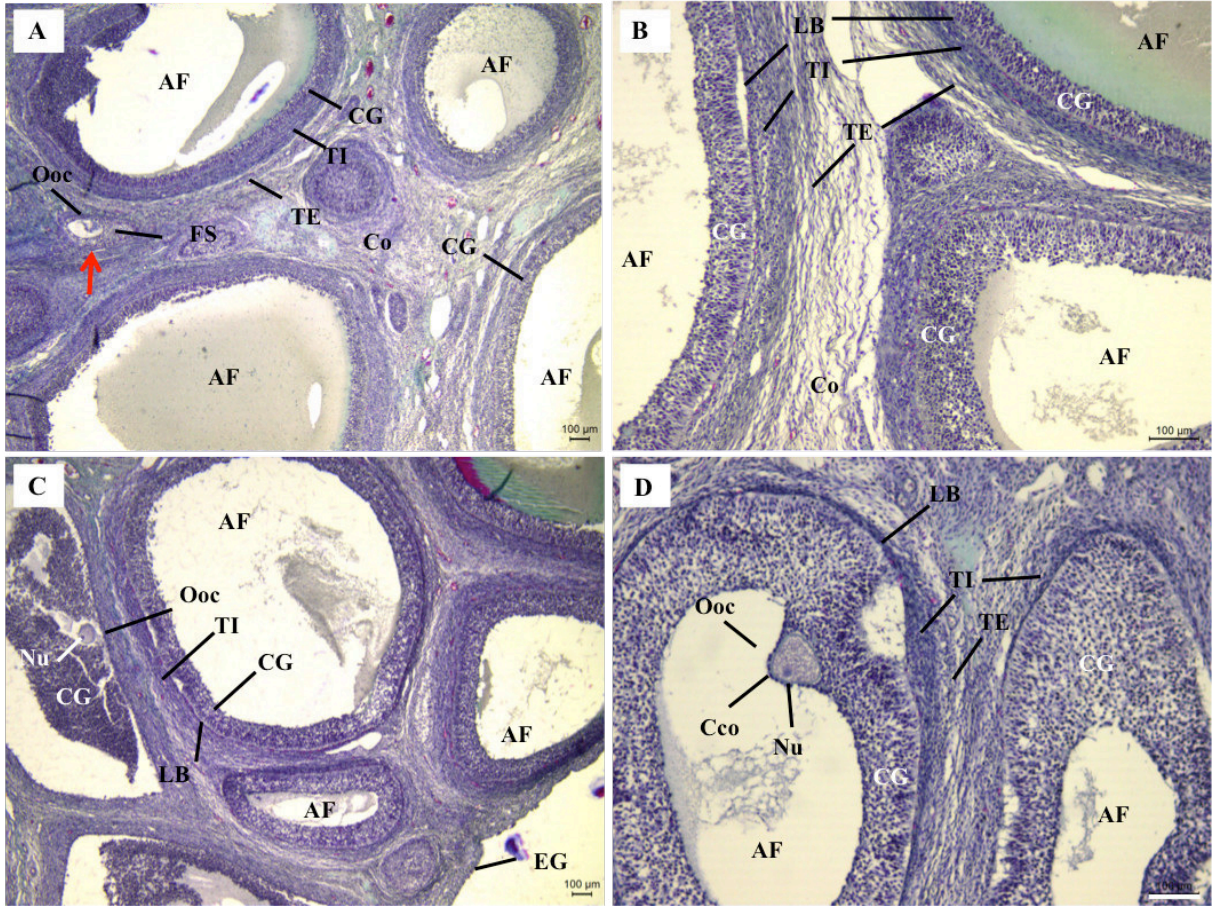
**Figura 12 - Fotomicrografias de tecido ovariano de suínos armazenado em diferentes tempos à 35,5 ° C. (A e B) armazenamento por 16 horas. (C e D) armazenamento por 24 horas. Grande presença de folículos danificados com células da granulosa (CG) retraídas da lâmina basal (LB) com núcleos picnóticos, difícil diferenciação das tecas interna (TI) e externa (TE), oócitos (Ooc) não envolvidos pelas células do *cumulus oophorus* (Cco), porém não apresentando retração citoplasmática. AF = antro folicular; Co = córtex; ZP = zona pelúcida.**



Fonte: autoral.

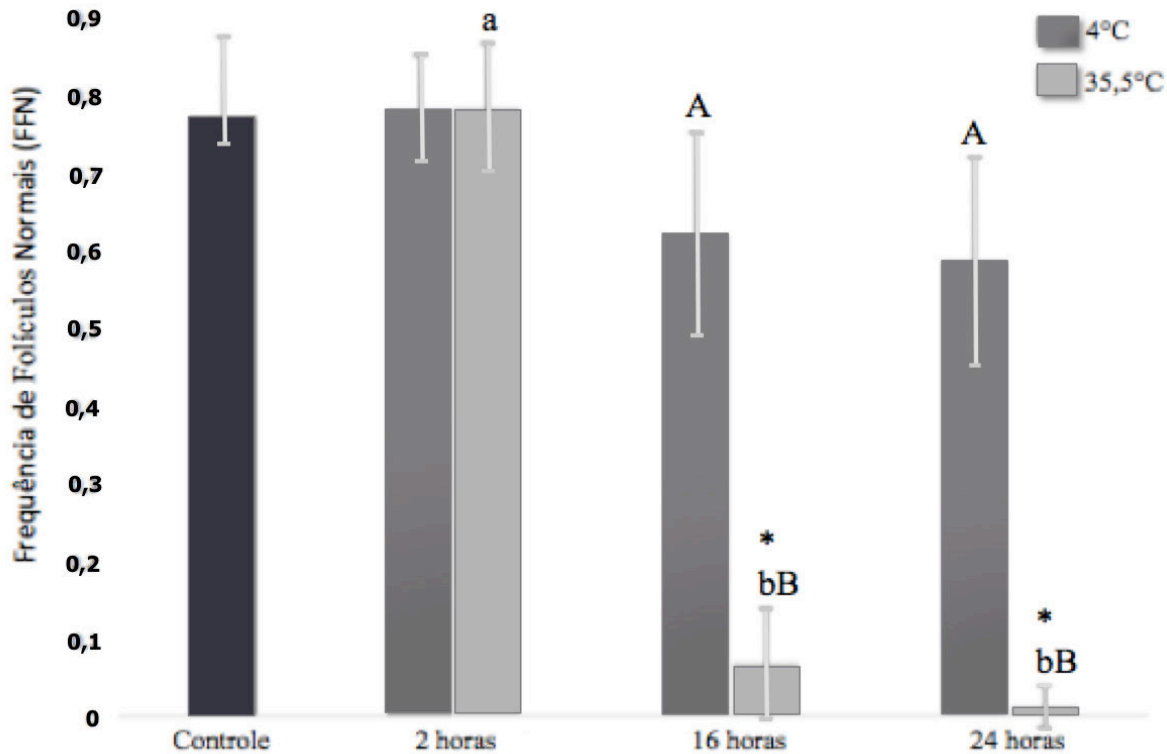


**Figura 13 - Fotomicrografias de tecido ovariano de suínos armazenado por diferentes tempos à 4 ° C. (A e B) armazenamento por 16 horas. (C e D) armazenamento por 24 horas. Tecido apresentando em sua maioria de folículos normais, com células da granulosa (CG) organizadas, oócitos (Ooc) com núcleos (Nu) normais, tecas interna (TI) e externa (TE) diferenciadas, porém presença em parte de folículos danificados, com CG retraídas da lâmina basal (LB) e alguns Ooc com retração citoplasmática (seta). AF = antro folicular; Cco = células do cumulus oophorus; Co = córtex; EG = epitélio germinativo; FS = folículos secundário.**



Fonte: autoral.

**Gráfico 2 - Frequência de folículos morfologicamente normais (FFN) em cada tratamento de conservação e controle, analisados em seções histológicas.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP calculada a partir de cinco réplicas. \* Diferem do controle ( $p < 0,05$ ). A, b Diferentes letras acima das barras indicam diferença significativa entre tratamentos dentro da mesma temperatura ( $p < 0,05$ ). A, B Diferentes letras acima das barras indicam diferença significativa entre tratamentos dentro do mesmo período de conservação ( $p < 0,05$ ).



Fonte: autoral.

O período de armazenamento dos ovários está entre os fatores que afetam a maturação oocitária (SUTTON *et al.*, 2003). Este armazenamento sem o devido fornecimento de sangue pode afetar a qualidade do oócito, já que o ambiente em torno deste torna-se prejudicado (WONGSRIKEEAO *et al.*, 2005). Oócitos de folículos em crescimento, embora quiescentes, sintetizam ativamente proteínas, além de ter suas organelas em desenvolvimento (LISBOA, *et al.*, 2011), ou seja, a conservação folicular neste período é de importância vital. A análise histológica de folículos conservados por 2 horas em ambas temperaturas revelou a integridade morfológica de uma maior quantidade de oócitos, obtendo resultados satisfatórios quando comparado com o controle.

Como os oócitos utilizados como fonte para a cultura *in vitro* são provenientes de ovários obtidos em abatedouros, a conservação destes órgãos é uma condição primordial para as biotécnicas reprodutivas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo sugere, através de análises histológicas, que o armazenamento ideal de tecido ovariano suíno para fins de biotécnicas reprodutivas possa ser realizado nas temperaturas de 35,5 ° C por 2 horas ou ainda a 4 ° C por até 24 horas.

O uso deste protocolo de preservação facilitará o transporte para laboratórios especializados e será útil para otimizar o uso de oócitos na reprodução animal.

Sugere-se a análise ultraestrutural e o cultivo *in vitro* de oócitos provenientes destes tratamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARON, J.W.; HSUEH, H.B.; TSAFRIRI, A. **Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process.** *Endocrine Reviews*, v. 15, p. 156-165, 2008.
- AERT, J.M.J.; BOLS, P.E.J. **Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species.** *Reproduction Domestic Animals*, v. 45, p. 171-179, 2010.
- ALVARENGA, A.L.N.; ZANGERONIMO, M.G.; OBERLENDER, G.; MURGAS, L.D.S. **Aspectos reprodutivos e estresse na espécie suína.** *Boletim Técnico*, v. 86, p. 1-40, 2011.
- ANDERSON, L.L. **Suínos.** In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. São Paulo: Manole, v. 7, p. 183-192, 2004.
- AMSTERDAM, A.; SASSON, R.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; RIMON, E.; LAND, A.; COHEN, T.; DOR, Y.; HIRSHO, L. **Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life.** *Biochemical Pharmacology*, v. 8, p. 1355-1362, 2003.
- ARRUDA, R.; PAES DE, VISITIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R. **Existem relações entre o tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos?** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, p. 233-239, 2001.
- BASSO, A.C.; ESPER, C.R. **Isolation and ultrastructural characterization of preantral follicles in the Nelore breed cows.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 311-319, 2002.
- BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M.R.; SVETLIKOVA, M.; WIMALASENA, J.; AYALA, M.E.; DOMINGUEZ, R. **Oogenesis in adult mammals, including humans: a review.** *Endocrine*, v. 26, p. 301-316, 2005.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. **Interaction between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis.** *Biology of Reproduction*, v. 43, p. 543-547, 1990.
- CANIPARI, R. **Oocyte-granulosa cell interactions.** *Human Reproduction Update*, v. 6, p. 279-289, 2000.
- CARROLL, J.; JONES, K.T.; WHITTINGHAM, D.G. **Ca<sup>2+</sup> release and the development of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization.** *Reviews of Reproduction*, v. 1, p. 137-143, 1996.
- CARVALHO, F.C.A.; LUCCI, C.M.; SILVA, J.R.V.; ANDRADE, E.R.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. **Effect of Braun-Collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in**

**situ.** *Animal Reproduction Science*, v. 66, p. 195-208, 2001.

CELESTINO, J.J.H.; SANTOS, R.R.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R.; COSTA, S.H.F.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R. **Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p. 591-599, 2007.

DIDION, B.A.; POMP, D.; MARTIN, M.J.; HOMANICS, G.E.; MARKET, C.L. **Observations of the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage.** *Journals of Animal Science*, v. 68, p. 2803-2810, 1990.

DRIANCOURT, M.A. **Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction.** *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1230, 2001.

DRIANCOURT, M.A.; THUEL, B. **Controlo f oocytes growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review.** *Reproduction, Nutrition, Development*, v. 38, p. 345-362, 1998.

DRUMMOND, A.E. **The role of steroids in follicular growth.** *Reproductive Biology Endocrinology*, v. 4, p. 1-11, 2006.

EVORA, P.R.B.; REIS, C.L.; FERREZ, M.A.; CONTE, D.A.; GARCIA, L.V. **Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio acidobásico – Uma revisão prática.** *Medicina*, v. 32, p. 451-469, 1999.

FERNANDES, C.B.; DEVITO, L.P.; MARTINS, L.R.; BLANCO, I.D.P.; LIMA, J.F.; TSURIBE, P.M.; GONÇALVES, C.G.P.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Artificial activation of bovine and quine oocytes with cyclohexamide, roscovitine, strontium, or 6-dimethylaminopurine in low or high calcium concentrations.** *Zygote*, v. 22, p. 387-394, 2012.

FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F.; SILVA, J.R.V.; ANDRADE, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. **Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarioan preatral follicles held in M199 or without indole-e-acetic acid supplementation.** *Theriogenology*, v. 55, p. 1607-1617, 2001.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. **Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle.** *Biology Reproduction*, v. 65, p. 648-654, 2001.

FRANCECHINI, N.; FULAN, M.D.P. **Hipotermia e seu uso na prática médica.** *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 5, p. 105-119, 2012.

GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. **Ovogênese.** In: GARCIA, S.M.LAURER DE; FERNÁNDEZ, C.G. *Embriologia*. Porto Alegre: Artmed, v. 3, p. 55-82, 2012.

GLEVA, G.F.; GOODGLICK, L.A.; KANE, A.B. **Altered calcium homeostasis in irreversibly injured P388D1 macrophages.** *The American Journal of Pathology*, v. 137, p.

43-57, 1990.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. **Selection of the dominant follicle in cattle.** *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GOUGEON, A. **Dynamics of human follicular growth: morphology, dynamics and functional aspects.** In: LEUNG, P. ADASHI, E. *The Ovary*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, v. 2, p. 25-43, 2003.

GRADELA, A.; MALHEIROS, R.; URBINA TFF, E.C.; BARBOSA, J.C.; ALMEIDA J.R. I.LUIS DE; ESPER, C.R. **Influência do folículo dominante sobre a dinâmica folicular ovariana em vacas Nelore tratadas com FSH.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, p. 325-329, 2000.

GRIFFIN, J.; EMERY, B.R.; HUANG, I.; PETERSON, C.M.; CARRELL, D.T. **Comparative analysis of follicle morphology and oocytes diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig and human).** *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*, v. 3, p. 1-9, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Anatomia da reprodução feminina.** In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. São Paulo: Manole, v. 7, p. 13-30, 2004a.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Foliculogênese, maturação oocitária e ovulação.** In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. São Paulo: Manole, v. 7, p. 69-82, 2004b.

HAFEZ, E.S.E.; JAINUDEEN, M.R.; ROSNINA, Y. **Hormônios, fatores de crescimento e reprodução.** In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. São Paulo: Manole, v. 7, p. 33-53, 2004.

HUSSEIN, M.R. **Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms.** *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 162-178, 2005.

JIAO, ZE-XU; WOODRUFF, T.K. **Detection and quantification of maternal-effect gene transcripts in mouse second polar bodies: potential markers of embryo developmental competence.** *Reproductive Biology*, v. 99, p. 2055-2061, 2013.

JOHNSON, A.L. **Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles.** *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 185-201, 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Aparelho reprodutor feminino.** In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 11, p. 431-451, 2011.

KAIPIA, A.; HSUEH, A.J.W. **Regulation of ovarian follicle atresia.** *Annual Review of Physiology*, v. 59, p. 349-363, 1997.

KANG, J.S.; LEE, C.J.; LEE, J.M.; RHA, J.Y.; SONG, K.W.; PARK, M.H. **Follicular expression of c-Kit/SCF and inhibin in mouse ovary during development.** The Journal of Histochemistry & cytochemistry, v. 51, p. 1447-1458, 2003.

KERR, J.F.R. **Definition of apoptosis and overview of its incidence.** In: LAVIN, M. & WATTER, D. Programed cell death – the cellular and molecular biology of apoptosis. Chur, Alemanha: Harwood Academic Publishers, 1993.

KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHISHI, M.; FUKUY, Y. **Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes.** Reproduction, v. 122, p. 131-138, 2001.

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L, JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. **Control of oocyte mammalian growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer.** Developmental Biology, v. 299, p. 1-11, 2006.

LISBOA, L.A.; ANDRADE, E.R.; ESPER, C.R.; SENEDA, M.M. **Análise ultra-estrutural de oócitos bovinos provenientes de folículos ovarianos com diferentes diâmetros.** Ciências Agrárias, v. 32, p. 1575-1582, 2011.

LUCCI, C.M.; SHREIER, L.L.; MACHADO, G.M.; AMORIM, C.A.; BÃO, S.N.; DOBRINSKY, J.R. **Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles.** Reproduction Domestic Animals, v. 42, p. 76-82, 2007.

MAGOFFIN, D.A. **Ovarian theca cell.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 37, p. 1344-1349, 2005.

MONTANARI, T. **Gametogênese.** In: MONTANARI, T. Embriologia: Texto, aula e roteiro de aulas práticas. Porto Alegre, v. 1, p. 7-33, 2013.

MOOR, R.M.; CROSBY, I.M. **Temperature-induced abnormalities in sheep oocyte during maturation.** Journals of Reproduction and Fertility, v. 75, p.467-473, 1985.

MORITA, W.; TILLY, J.L. **Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass.** Developmental Biology, v. 213, p. 1-17, 1993.

OLIVEIRA, C.J.; GIAVAROTTI, L.S.; SANTOS, J.M.S. **Apoptose celular durante o desenvolvimento.** In: GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. Embriologia. Porto Alegre: Artmed, v. 3, p. 289-297, 2012.

PARROT, J.A.; SKINNER, M.K. **Kit ligand on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production.** Molecular Reproduction and Development, v. 55, p. 55-64, 2000.

PICINATO, M.C.; ARAÚJO, M.; ARAÚJO, C.H.M.; ROCHA, M.G.; MARTINS, W.P.; DOS REIS, R.M.; FERRIANI, R.A.; DE ALBUQUERQUE, P.A.; NAVARRO, S.

**Morfologia do primeiro corpúsculo polar e taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 30, p. 360-265, 2008.

PONTELO, T.P. **Desenvolvimento gonadal de fetos suínos e sua relação com medida fetais.** 2015. 81f. Dissertação (mestrado em ciências veterinárias) – Programa de Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2015.

ROBBINS; COTRAN. **Respostas células ao estresse e aos estímulos tóxicos: adaptação, lesão e morte.** In: ROBBINS; COTRAN. Patologia: Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 8, p. 3-42, 2010.

ROY, S.K.; TREACY, B.J. **Isolation and long-term culture of human preantral follicles.** Fertility and Sterility, v. 59, p. 783-790, 1993.

SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; ANDRADE, E.R.; FERREIRA, M.A.L.; FIGUEIREDO, J.R. **Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro.** Animal Reproduction Science, v. 66, p. 209-223, 2001.

SILVA, V.B. **Conservação de tecido ovariano equino em diferentes temperaturas e períodos de tempo.** 2012. 51f. Dissertação (mestrado em ciência animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. **The earliest stages of folliculogenesis in vitro.** Reproduction, v. 123, p. 185-202, 2002.

SUH, C.S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G.F. **The ovarian life cycle: a contemporary view.** Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, v. 3, p. 5-12, 2002.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. **Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity.** Human Reproduction Update, v. 9, p. 35-48, 2003.

VAJTA, J.; RIENZI, L.; COBO, A.; YOVICH, J. **Embryo culture: can we perform better than nature?** Reproduction BioMedicine Online, v. 20, p. 453-469, 2010.

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

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; AGUNG, B.; NII, M.; NAGAI, T. **Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes.** Journal of Reproduction and Development, v. 51, p. 87-97, 2005.

YANG, B.S.; IM, G.S.; PARK, S.J. **Characteristics of Korean native, Hanwoo, calves produced by transfer of in vitro produced embryos.** Animal Reproduction Science, v. 67, p. 153-158, 2001.



**ZEISS, C.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice.**  
Veterinary Pathology, v. 40, p. 481-495, 2003.

---