



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

**EFEITO DA CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS A  
BAIXAS TEMPERATURAS NA MORFOLOGIA DE  
OVÓCITOS IMATUROS INCLUSOS EM FOLÍCULOS  
OVARIANOS PRIMORDIAIS SUÍNOS**

**Rogério Campos Barroso de Brito**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA/DF**  
**Abril/2008**

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

**EFEITO DA CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS A BAIXAS TEMPERATURAS NA  
MORFOLOGIA DE OVÓCITOS IMATUROS INCLUSOS EM FOLÍCULOS  
OVARIANOS PRIMORDIAIS SUÍNOS**

**ROGÉRIO CAMPOS BARROSO DE BRITO**

**ORIENTADOR: CAROLINA MADEIRA LUCCI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 293/ 2008**

**BRASÍLIA/DF**  
**Abril/2008**

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

**EFEITO DA CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS A BAIXAS TEMPERATURAS NA  
MORFOLOGIA DE OVÓCITOS IMATUROS INCLUSOS EM FOLÍCULOS  
OVARIANOS PRIMORDIAIS SUÍNOS**

**ROGÉRIO CAMPOS BARROSO DE BRITO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,  
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE  
DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO ANIMAL**

**APROVADA POR:**

---

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Doutorado (UnB)  
CPF: 490.390.241-20 E-mail: cmlucci@unb.br**

---

**JAIRO PEREIRA NEVES, Doutorado (UnB)  
CPF: 065.863.509-30 E-mail: jpneves@unb.br**

---

**SILENE DE PAULINO LOZZI, Doutorado (UnB)  
CPF: 491.662.046-15 E-mail: silene@unb.br**

**BRASÍLIA/DF, 28 de abril de 2008.**

Brito, Rogério Campos Barroso

Efeito da conservação de ovários a baixas temperaturas na morfologia de ovócitos imaturos inclusos em folículos ovarianos primordiais suínos. / Rogério Campos Barroso de Brito; orientação de Carolina Madeira Lucci. – Brasília, 2008.

40 p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Resfriamento. 2. folículos ovarianos primordiais suínos. 3. cultivo *in vitro*. 4. Folículos Primordiais Suínos. I. Lucci, C.M. II. Doutorado.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BRITO, R.C.B. **Efeito da conservação de ovários a baixas temperaturas na morfologia de ovócitos imaturos inclusos em folículos ovarianos primordiais suínos** -Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 40 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Rogério Campos Barroso de Brito

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: EFEITO DA CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS A BAIXAS TEMPERATURAS NA MORFOLOGIA DE OVÓCITOS IMATUROS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRIMORDIAIS SUÍNOS

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Assinatura \_\_\_\_\_

Rogério Campos Barroso de Brito

891.977.471-49

SMPW quadra 11; conjunto 3; lote3, Park Way.

71741-100 – Brasília/DF - Brasil

(61) 3338 7092, [rogibrito@hotmail.com](mailto:rogibrito@hotmail.com)

## ÍNDICE

<b>Capítulo Único/Sub-capítulos</b>	<b>Página</b>
INTRODUÇÃO GERAL-----	1
REVISÃO DE LITERATURA-----	2
Folículos ovarianos -----	2
Foliculogênese e ovogênese-----	4
Atresia-----	6
Moifopa -----	7
Isolamento-----	7
Cultivo <i>in vitro</i> -----	9
Conservação -----	10
MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE FOPA -----	12
JUSTIFICATIVA-----	14
OBJETIVOS -----	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	16
<b>CAPÍTULO ÚNICO -----</b>	<b>20</b>
EFEITO DA CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS A BAIXAS TEMPERATURAS NA MORFOLOGIA DE OVÓCITOS IMATUROS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRIMORDIAIS SUÍNOS	
RESUMO -----	21
ABSTRACT -----	22
INTRODUÇÃO -----	23
MATERIAL E MÉTODOS-----	25
Obtenção dos ovários e dinâmica experimental-----	25
Microscopia de luz -----	26
Microscopia eletrônica de transmissão-----	27
Procedimento de cultivo <i>in vitro</i> -----	27
Análise estatística-----	28
RESULTADOS-----	28
Microscopia de luz -----	28
Microscopia eletrônica de transmissão-----	30
Controle abatedouro (Fresco) e lab.-----	30
Resfriamento sem cultivo-----	31
Controle cultivo-----	33
Resfriamento com posterior cultivo-----	34
DISCUSSÃO -----	36
CONCLUSÕES -----	38
AGRADECIMENTOS-----	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	39

## ÍNDICE

<b>Tabelas e Figuras</b>	<b>Página</b>
QUADRO 1 - Tipos de Folículos -----	3
<b>Capítulo Único</b>	
FIGURA 1 - Ovário suíno pré-púbere -----	25
FIGURA 2 - Esquema de execução do resfriamento -----	26
FIGURA 3 - Folículos primordiais suínos normais -----	28
FIGURA 4 - Porcentagem de FMN nos tratamentos -----	29
TABELA 1- As médias dos FMN seguidas dos desvios padrões ---	29
FIGURA 5 - Folículos Primordiais Degenerados -----	30
FIGURA 6 - Folículo primordial suíno do grupo controle abate -----	31
FIGURA 7- Íntimo contato com microvilosidades -----	32
FIGURA 8 - Folículo mantido a 4 <sup>o</sup> C por 18 hs -----	32
FIGURA 9 - Folículo mantido a 20 <sup>o</sup> C por 18 hs -----	33
FIGURA 10 - Folículos do grupo controle cultivo. -----	34
FIGURA 11 - Folículo mantido a 4 <sup>o</sup> C por 18 hs e cultivado <i>in vitro</i>	35
FIGURA 12 - Folículo mantido a 20 <sup>o</sup> C por 18 h e cultivado <i>in vitro</i>	35

## LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA – Análise de Variância;

CIV – Cultivo *in vitro*;

CONTROLE LAB. – Controle  
Laboratório;

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono;

cm<sup>2</sup> – centímetro quadrado;

DNAse – Enzima  
ácidodesoxiribonuclease;

DP – Desvio Padrão;

FMN – Folículo Morfologicamente  
Normal;

FGF-2 – Fator de crescimento  
fibroblástico 2;

FOPA – Folículo Ovariano Pré-Antral;

FSH - Hormônio Folículo Estimulante;

GnRH - Hormônio liberador de  
gonadotrofinas;

HE - hematoxilina e eosina;

HHG – eixo hipotálamo hipófise  
gonadal

hs – horas;

IAA – Ácido indol-acético  
(Índole-3-Acetic Acid);

ICSI - Injeção de espermatozóide  
intracitoplasmática;

ITS – Insulina Transferrina Selênio;

LH - Hormônio Luteinizante;

M – Molar;

M II – Metáfase dois;

MET - Microscopia Eletrônica de  
Transmissão;

mL – mililitro;

mm<sup>2</sup> – Milímetro quadrado;

MO – Microscopia Óptica;

MOIFOPA – Manipulação dos  
ovócitos inclusos em folículos  
ovarianos pré-antrais;

ng – nanograma;

nm – nonômetro;

RNA – Ácido Ribonucléico;

µm – micrômetro;

µg – micrograma.

EFEITO DA CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS A BAIXAS TEMPERATURAS NA  
MORFOLOGIA DE OVÓCITOS IMATUROS INCLUSOS EM FOLÍCULOS  
OVARIANOS PRIMORDIAIS SUÍNOS  
RESUMO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade de folículos primordiais suínos após período de hipotermia com ou sem cultivo *in vitro*. A baixa temperatura tem sido usada para reduzir o metabolismo celular e minimizar a degradação tecidual. Foram utilizados 4 ovários de 4 animais pré-púberes oriundos de abatedouro. Como controle, pedaços de córtex ovariano foram fixados no abatedouro (Controle Abate) e no momento em que chegaram ao laboratório (Controle Lab). Como controle do cultivo, pedaços de córtex foram destinados ao cultivo *in vitro* assim que chegaram ao laboratório (Controle CIV). Os ovários foram transportados ao laboratório a 36-38°C em no máximo 1 hora. No laboratório, pedaços de córtex ovariano foram dissecados e mantidos em solução salina estéril a 4°C ou 20°C por 6, 12 ou 18hs. Após o resfriamento de todas as amostras, em cada tratamento houve um fragmento do córtex que foi fixado e outro que foi submetido ao cultivo *in vitro* por duas horas e então fixado posteriormente. O cultivo *in vitro* foi realizado utilizando meio Waymouth suplementado com piruvato, glutamina, ITS, ácido ascórbico, antibióticos e soro fetal bovino, a 38°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. A finalidade do cultivo *in vitro* de curta duração foi somente restabelecer a temperatura e o metabolismo celular, não havendo a intenção de promover crescimento, para que as células pudessem expressar morfolologicamente possíveis danos moleculares que tenham sofrido durante o tratamento. Após a fixação, todas as amostras foram preparadas para histologia. Somente os folículos primordiais foram contados e classificados como morfolologicamente normais (FMN) ou degenerados. Os tratamentos foram comparados entre si por ANOVA e teste de Scheffe's. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) sob análise de microscopia de luz. É possível preservar ovários suínos a 4°C ou 20°C por até 18h, mantendo alta porcentagem de folículos primordiais morfolologicamente normais (FMN). Na maioria dos tratamentos pode ser notada uma tendência em aumentar a porcentagem de FMN quando o cultivo *in vitro* foi realizado. O cultivo *in vitro* não mostrou danos submorfológicos que poderiam ter sido causados durante o período de resfriamento. Os resultados ultra-estruturais

mostram que folículos primordiais em tecido ovariano mantido a 4°C ou 20°C por 18hs não apresentaram alterações ultra-estruturais que comprometessem sua viabilidade. Além disso, os tratamentos cultivados *in vitro* por 2h proporcionaram uma melhor integridade celular dos folículos primordiais suínos.

Palavras chaves: Resfriamento, folículos ovarianos primordiais suínos, cultivo *in vitro*.

EFFECTS OF LOW TEMPERATURE MAINTENANCE OF OVARIES ON THE  
MORPHOLOGY OF PIG PRIMORDIAL FOLLICLES: AN ULTRASTRUCTURAL  
APPROUCH  
ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the viability of pig primordial follicles after low temperature maintenance. Four ovaries from 4 gilts collected at a local slaughterhouse were used. As controls, samples of ovarian cortex were fixed at the slaughterhouse (slaughter control) an as soon as they got to the laboratory (LAB control). Also, fresh cortex samples were placed in *in vitro* culture (CIV control). The ovaries were transported to the Lab at 36-38°C within 1 hour. In the Lab, samples of ovarian cortex were dissected and maintained in sterile saline solution at 4 °C or 20 °C for 6h, 12h or 18h. After the incubation time of all treatments, one sample of each treatment was fixed and another was placed in *in vitro* culture for 2h and than fixed. The *in vitro* culture was performed using Waymouth medium supplemented with pyruvic acid, glutamine, ITS, ascorbic acid, antibiotics and fetal calf serum, at 38 °C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air. The aim of this short *in vitro* culture was only return the tissues to their normal temperature and metabolism (there was no intention to promote growth). This way, the cells could morphologically express molecular damage that could have occurred during the cooling. After fixation, all samples were processed for histology. Only primordial follicles were counted and classified as morphologically normal (FMN) or degenerated. Treatments were compared among each other using ANOVA and Scheffe's test. No significant difference was observed among treatments (P>0.05) under the light microscopy analysis. It is possible to preserve pig ovaries at 4°C or 20°C for up to 18h, keeping a high percentage of morphologically normal primordial follicles. The most treatments a tendency to improve the percentage of FMN could be noted when *in vitro* culture was performed. The *in vitro* culture did not show submorphological damage that could be caused during low temperature preservation. Our results ultrastructural indicate that the treatments *in vitro* cultured for 2h showed better conditions viability and cellular integrity of pig primordial follicles.

Key words: Chilling, pig primordial follicles, *in vitro* culture.

## Introdução Geral

O Distrito Federal se encontra em uma região onde a agropecuária vem se desenvolvendo muito nos últimos anos. Dentre os setores produtivos da região Centro-Oeste, tem-se destacado o grande desenvolvimento da suinocultura. Além disso, no Distrito Federal e entorno, há uma grande área de preservação ambiental, com um número considerável de espécies animais que merecem proteção e atenção à sua reprodução por estarem ameaçados de extinção ou sofrendo redução significativa de sua população. Dentre estes animais encontram-se espécies da mesma família dos suínos domésticos, como o cateto e a queixada.

As pesquisas na área de reprodução animal proporcionam um grande avanço na multiplicação de animais de elevado potencial genético e valor econômico, além de serem uma importante ferramenta para os programas de preservação de raças e espécies ameaçadas de extinção. Biotécnicas reprodutivas, tais como a inseminação artificial, sincronização de estro, fecundação *in vitro* e transferência de embriões são as mais largamente conhecidas e utilizadas. Mais recentemente, outra biotécnica conhecida como manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) tem se destacado nas pesquisas e visa à otimização do potencial reprodutivo das fêmeas pela estocagem, crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos ovócitos provenientes de folículos ovarianos pré-antrais. Além das etapas de isolamento e cultivo folicular *in vitro*, a biotécnica de MOIFOPA abrange também a conservação dos ovócitos inclusos nestes folículos.

A conservação a curto prazo tem grande importância para o transporte de ovários do local de coleta até os laboratórios especializados. Este tipo de conservação consiste na diminuição da temperatura do tecido, na tentativa de reduzir o metabolismo e retardar os processos de degeneração celular. É importante realizar tal procedimento em suínos, pois existem escassos relatos a respeito do resfriamento de tecido ovariano.

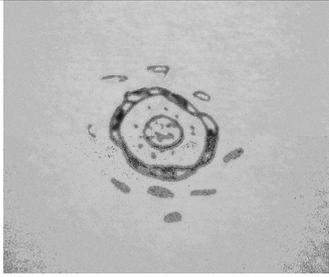
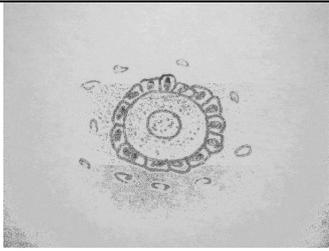
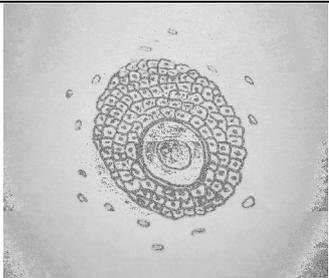
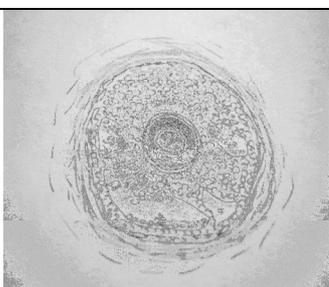
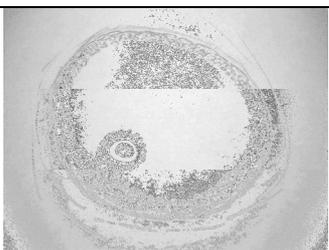
## **Revisão de Literatura**

### **Folículos Ovarianos**

Os folículos ovarianos são estruturas morfofuncionais dos ovários que permitem a eles realizar suas duas principais funções: uma exócrina, a produção cíclica de ovócitos férteis e outra endócrina, a produção e liberação de hormônios esteróides (Hafez & Hafez, 2004). Os folículos são constituídos por um ovócito circundado por células somáticas ou foliculares. Estas células foliculares são essenciais para a manutenção da viabilidade ovocitária, assegurando o crescimento, maturação e posterior liberação de um ovócito já maduro no processo de ovulação (Figueiredo et al, 2002).

Os folículos podem ser divididos em dois grandes grupos, pré-antrais e antrais, cuja diferença está na presença ou não de uma cavidade chamada de antro, repleta de líquido folicular. No entanto, estes folículos podem ainda ser subdivididos de acordo com a fase de desenvolvimento em que se encontram. No quadro 1, segue um resumo dos tipos de folículos divididos de acordo com o grau de evolução dos mesmos.

Quadro 1. Classificação e descrição morfológica dos tipos de folículos ovarianos de acordo com seu grau de desenvolvimento.

Folículos Pré-antrais (FOPA)	Primordial		Ovócito imaturo circundado por uma camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa.
	Primário		Ovócito imaturo circundado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica.
	Secundário		Ovócito imaturo circundado por duas ou mais camadas da granulosa de forma cúbica. A zona pelúcida e as células da teça já podem ser evidenciadas.
Folículos Antrais	Terciário		Marcado pelo início da formação da cavidade antral devido à produção do líquido folicular pelas células foliculares.
	Pré-ovulatório		Fim da formação do antro, há dois tipos de células da granulosa, as células da granulosa murais na parede do folículo e as células da corona radiata, que envolvem intimamente o ovócito.

Fonte: Hulshof et al.,1994; Braw-Tal & Yossefi, 1997; Figueiredo et al, 2002; Hafez & Hafez, 2004.

## **Foliculogênese e Ovogênese**

A foliculogênese, entendida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, ocorrerá quase que totalmente de forma simultânea à ovogênese, que é o processo de formação dos gametas femininos, desde a proliferação das células germinativas primordiais até a formação de um ovócito haplóide. Ambas têm início no período fetal, porém a foliculogênese termina no momento da ovulação do folículo maduro, enquanto que a ovogênese se encerra somente com a fecundação (Figueiredo et al, 2002).

Durante o desenvolvimento fetal, células de origem extragonadal que migraram do saco vitelínico para as cristas gonadais, sofrem mitoses sucessivas dando origem às ovogônias. Logo em seguida estas começam a sofrer a primeira divisão meiótica que será paralisada em prófase I, formando milhões de ovócitos primários, que serão circundados por uma única camada de células foliculares de aspecto pavimentoso, formando assim os folículos primordiais (Hafez & Hafez, 2004). Nesse momento ocorre uma interrupção no processo de multiplicação das células da pré-granulosa, os folículos primordiais entram em estado de dormência ou quiescência, estado que só será interrompido quando esse folículo for ativado (Hirshfield, 1991).

Estudos demonstraram que fatores de crescimento ativam folículos primordiais, que são transformados em primários, secundários e pequenos folículos antrais, sucessivamente. No entanto, pouco desse processo de ativação e desenvolvimento é conhecido, principalmente quando se compara à quantidade de informações já elucidadas no que diz respeito ao desenvolvimento de folículos antrais (Figueiredo et al, 2002).

Após a ativação dos folículos primordiais, inúmeras alterações começam a ocorrer, a primeira delas é a transformação das células da granulosa de pavimentosas para cúbicas, dando origem aos folículos primários, seguida pela proliferação dessas células, formando os folículos secundários. Concomitantemente, o ovócito começa a aumentar de tamanho, suas organelas se multiplicam, a zona pelúcida começa a ser formada entre o ovócito e as células da granulosa, observa-se um aumento na síntese de RNA, acúmulo de lipídios e absorção de nutrientes. Com o desenvolvimento do folículo, a cavidade antral começa a se formar em função da produção de

líquido folicular pelas células da granulosa, dando origem aos folículos antrais iniciais, ou pequenos folículos terciários (Figueiredo et al., 2002).

A parte final da foliculogênese, assim como da ovogênese, é dependente das gonadotrofinas e caracteriza-se pelas fases de recrutamento, seleção e dominância dos folículos antrais, que começa a ocorrer na puberdade. Por definição, a puberdade é definida quando um animal começa a liberar seus gametas e exibir comportamento sexual, sendo que seu início é regulado pela maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG). Dessa forma, o padrão de liberação do GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofinas) é modificado, influenciando assim, de maneira mais eficiente, a liberação das principais gonadotrofinas pela adenohipófise. Os principais hormônios adenohipofisários são o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH). Ambos possuem ação nos ovários (Hafez et al., 2004).

O FSH possui como função principal o crescimento e o desenvolvimento dos folículos antrais, promovendo um crescimento rápido de volume, devido ao acúmulo de líquido folicular. A proliferação celular declina ao mesmo tempo em que ocorre a diferenciação das células da granulosa e da teca (Figueiredo et al., 2002). Posteriormente, a fase antral do desenvolvimento folicular é dependente das gonadotrofinas, que induzem o recrutamento e o crescimento sincronizado de folículos antrais em ondas foliculares (Fortune et al., 2001). No momento em que a fêmea alcança a puberdade, aumento das concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento e emergência da onda folicular (Adams et al., 1992). No caso dos suínos, cerca de 10 a 25 folículos são selecionados dentre os recrutados (Hafez & Hafez, 2004).

No folículo pré-ovulatório, o FSH estimula a mitose das células da granulosa e formação do líquido folicular, além de aumentar a sensibilidade das células da granulosa para o LH (aumento no número de receptores). O LH, por sua vez, atua em níveis basais, juntamente com o FSH no sentido de induzir a secreção de estrógeno do folículo ovariano desenvolvido. Já o pico de LH causa a ruptura da parede folicular, ovulação e posterior luteinização das células remanescentes foliculares (Hafez et al., 2004).

O crescimento, o desenvolvimento, a ovulação e a luteinização dos folículos antrais dependem de padrões apropriados de secreção, concentração

e proporção de LH, FSH entre outros hormônios. Durante o ciclo estral, a liberação de LH e FSH na forma de pulsos ou ondas é controlada pela retroalimentação negativa das gônadas. Um segundo tipo de liberação de LH e FSH, denominada pico pré-ovulatório ocorre devido ao aumento na concentração de estrógenos circulantes que causa uma retroalimentação positiva sobre o hipotálamo, induzindo liberação de GnRH e o conseqüente pico pré-ovulatório de LH e FSH. A elevação dos níveis de estradiol é responsável pelo aparecimento dos sinais de cio. A duração do cio nas porcas varia entre 40 e 60 horas, já a ovulação ocorre cerca de 38 a 42 horas após o início do cio. Alterações como maturação citoplasmática e nuclear do ovócito, separação das células do *cumulus* do restante das células da granulosa e afinamento e ruptura da parede folicular externa são típicas do processo ovulatório (Hafez & Hafez, 2004).

No que diz respeito à ovogênese, durante todo o processo de crescimento folicular descrito, o ovócito permanece com a meiose interrompida no estágio de prófase I. Devido à ocorrência de liberações pré-ovulatórias de LH, algumas horas antes da ovulação, a meiose é retomada. Ocorre o rompimento da vesícula germinativa e expulsão do primeiro corpúsculo polar, formando assim, o ovócito secundário, que por sua vez, inicia a segunda divisão meiótica que também é interrompida, dessa vez em Metáfase II (M II), e só será retomada com a fecundação (Figueiredo et al., 2002).

## **ATRESIA**

A biotecnologia da MOIFOPA (Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais) trabalha essencialmente com folículos ovarianos. Os folículos primordiais constituem a reserva de folículos quiescentes (Beckers et al., 1996) e compreendem 90% da população folicular do ovário mamífero (Erickson, 1986). Porém, apenas uma pequena parte desses (cerca de 0,1%) será ovulado, tendo alguma probabilidade de ser fecundado. O restante entrará em processo de atresia pelas próprias condições do ambiente ovariano (Figueiredo et al, 2002). Ou seja, para cada ovócito que chega à maturação e ovulação, vários iniciam o desenvolvimento, mas nunca atingem o completo desenvolvimento (Hafez & Hafez, 2004). A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, que pode ocorrer por via

degenerativa e/ou apoptótica. Os folículos que regridem são invadidos por células inflamatórias, e a área previamente ocupada por eles acaba sendo preenchida por tecido conjuntivo, e o folículo é então substituído por uma cicatriz ovariana, conhecida como corpo atrésico (Cunningham, 1993).

A atresia parece ser um dos elementos que controla o número de folículos selecionados até chegar à ovulação, no entanto, pouco ainda se sabe sobre a duração precisa do processo (Figueiredo et al, 2002). Durante esse período, os folículos ovarianos passam por mudanças degenerativas durante as quais sua integridade é perdida. Essas alterações podem vir a ocorrer em estágios diversos de crescimento e do ciclo ovariano, porém, ocorrem mais freqüentemente em estágios avançados do crescimento folicular (Hafez & Hafez, 2004). Independente da fase na qual ocorre e, apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de ovócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (Figueiredo et al, 2002).

## **MOIFOPA**

A biotecnologia que manipula os folículos pré-antrais (MOIFOPA) visa aproveitar ao máximo o potencial reprodutivo de uma fêmea, reduzindo o desperdício *in vivo* do potencial reprodutivo gerado por ela. A MOIFOPA consiste basicamente em isolar do ovário o folículo intacto ou *in situ*, cultivar e conservar o material em questão.

### **Isolamento**

O primeiro passo para a biotécnica de MOIFOPA é definir o melhor método de isolamento dos folículos de forma a se obter o maior número, com a melhor viabilidade possível, para então se proceder as técnicas de crescimento e cultivo *in vitro* (Telfer, 1996).

Vários métodos de isolamento folicular já foram desenvolvidos em diferentes espécies. Dentre eles, em camundongos (Eppig, 1976), suínos (Lazzari et al., 1992), bovinos (Hulshof et al., 1994), caprinos (Lucci et al., 1999), ovinos (Amorim et al., 2000) e em humanos (Roy and Treacy, 1993).

Dentre as várias espécies de animais utilizadas em pesquisas no que se refere ao isolamento folicular, parece haver afinidade entre um método específico e uma espécie em questão. Para tanto, a eficiência do método depende de características do estroma, da quantidade de folículos antrais presentes, entre outras. Por esse motivo, isolar folículos pré-antrais de animais domésticos adultos é mais difícil do que de roedores, já que os ovários são mais fibrosos por natureza (Gupta *et al.*, 2002).

São basicamente três maneiras que os pesquisadores isolam folículos ovarianos do estroma. A primeira se refere ao uso de enzimas proteolíticas, a segunda forma pela separação mecânica do folículo intacto e a terceira de uma associação das duas anteriores.

A separação enzimática é o método mais caro, porém, geralmente apresenta um maior rendimento de folículos isolados, pode ser descrita pela utilização de três principais enzimas proteolíticas, a tripsina (Lazzari *et al.*, 1992), a colagenase (Roy and Treacy, 1993; Wandji *et al.*, 1996) e a pronase (Roy and Greenwald, 1985).

Segundo autores, a colagenase tem se mostrado mais eficiente e menos deletéria aos ovócitos, apesar dos folículos ficarem desprovidos das células da teca e constituírem um complexo de células da granulosa-ovócito sob uma membrana basal parcialmente degradada (Buccione *et al.*, 1990). A Dissociação enzimática pela colagenase resultou em grande número de folículos pré-antrais a partir de ovários de camundongos (Torrance *et al.*, 1989) e a colagenase associada à DNase, por 1 hora a 37°C, não causou danos morfológicos aos folículos pré-antrais de humanos (Roy & Treacy, 1993) e de cães (Bolamba *et al.*, 2002).

Em suínos, o isolamento enzimático foi descrito por Lazzari *et al.* (1992) que relataram passos do procedimento para folículos ovarianos em estágios iniciais de desenvolvimento oriundos de ovários de leitoas recém nascidas. Greenwald & Moor (1989) também isolaram pequenos folículos primordiais de ovários suínos pela incubação de pedaços do córtex ovariano em colagenase. Após isso, usaram um gradiente descontínuo de Percoll para separar os folículos primordiais das células somáticas indesejadas.

Entretanto, Telfer *et al.* (2000) relatam que em suínos, o método mecânico de microdissecção é mais conveniente para o isolamento de folículos pré-antrais maiores, em função do estroma ser mais frouxo.

Já a separação mecânica entre o folículo intacto e o estroma adjacente tende a ser um método mais barato, geralmente com um rendimento menor de folículos isolados em comparação ao método enzimático. A separação mecânica foi descrito por Figueiredo et al. (1993), Hulshof et al. (1994), Lucci et al. (1999), Amorim et al. (2000).

Algumas espécies apresentam limitações quanto aos métodos. Por exemplo, em bovinos há uma maior sensibilidade folicular ao uso da enzima colagenase (Wandji et al., 1996), sendo assim, em função do estroma dos bovinos ser rico em fibras e bastante denso (Telfer et al., 2000), os métodos mecânicos são mais comumente utilizados. Dentre eles se encontram o uso do mixer (Nuttinck et al., 1993), o fórceps (Hulshof et al., 1994), tesouras (Caramula et al., 1996) e do *tissue choper* (Figueiredo et al., 1993).

A combinação entre a dissociação enzimática com colagenase e a dissecação mecânica proporcionou a recuperação de maior número de folículos em relação ao método mecânico simples em vacas (Figueiredo *et al.*, 1993). O método enzimático rende mais que cinco vezes o número de folículos pré-antrais que o método mecânico em bubalinos (Gupta *et al.*, 2001).

### **Cultivo *In Vitro***

Após isso, os folículos isolados do ovário demandam de condições *in vitro* que visam, ou no mínimo se aproximam das condições fisiológicas *in vivo*. Dessa forma, o cultivo *in vitro* é necessário e deve ser compatível ao estágio de desenvolvimento folicular. Para tanto, é necessário e fundamental o cultivo *in vitro*. O cultivo de folículos imaturos é bastante promissor (Telfer, 2001).

Os melhores resultados de desenvolvimento *in vitro* a partir de folículos ovarianos pré-antrais são referentes aos camundongos. Sendo assim, a partir de camundongos fêmeas de 12 dias de idade, pode-se obter jovens vivos após isolamento de folículos pré-antrais, cultivo dos mesmos, maturação ovocitária, fertilização *in vitro* e transferência dos embriões (Eppig & Schroeder; 1989). O desenvolvimento completo dos ovócitos de camundongos *in vitro*, vindos de folículos primordiais, auxíla o esclarecimento de futuros estudos em humanos e em animais de grande importância zootécnica (Eppig & O'Brien; 1996).

A biotecnologia de MOIFOPA referente aos camundongos se encontra em nível superior de evolução frente às demais espécies. Sendo assim, é

possível ainda obter fetos vivos a partir de folículos pré-antrais congelados/descongelados e isolados de camundongos (Carrol et al., 1990; Carrol et al., 1993).

Os melhores resultados obtidos até o momento em espécies domésticas sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais são referentes a espécie bubalina. Segundo Gupta et al. (2008) é possível produzir embriões de búfalo por fertilização *in vitro* de ovócitos oriundos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Em bovinos, Gutierrez et al. (2000) relataram o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos até o estágio antral.

Com relação aos suínos, foram obtidos melhores resultados, pois foi descrito que ovócitos suínos de folículos pré-antrais podem crescer até o seu tamanho final e adquirir competência meiótica (Hirao et al., 1994).

Em cabras, Matos et al. (2007) concluíram que a concentração de 50 ng/mL FGF-2 não apenas manteve a integridade morfológica dos folículos pré-antrais cultivados por 5 dias, mas também estimulou a ativação dos folículos primordiais e o seu crescimento.

Por outro lado, segundo Wu et al. (2001a), folículos pré-antrais suínos cultivados por somente 4 dias apresentaram antro, ovócitos foram maturados e fertilizados por ICSI (Injeção de espermatozóide intracitoplasmática) e puderam se desenvolver até o estágio de blastocisto. Esse é o primeiro relato de formação de embriões em espécies domésticas, a partir de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais.

## **Conservação**

A conservação do tecido manipulado em questão pode ser realizada em duas formas, a curto prazo (Resfriamento) e a longo prazo (Criopreservação). Muitas vezes, em função da obtenção de um grande número de folículos pré-antrais isolados, deve-se fazer uso da conservação a curto prazo (resfriamento). Pois dessa forma, o manejo laboratorial deve fornecer iguais condições a todos os folículos pré-antrais isolados. Para isso, é importante resfriar o tecido não submetido ainda ao cultivo *in vitro*, necessitando do amparo da conservação a curto prazo, de maneira a minimizar os efeitos degenerativos dos folículos.

Além disso, em conjunto com técnicas de conservação a baixas temperaturas, o cultivo de folículos imaturos apresenta um potencial em otimizar os sistemas de produção *in vitro* de embriões (Telfer, 2001).

Vários estudos foram e estão sendo desenvolvidos no que diz respeito aos processos que minimizam a degeneração celular de tecidos já retirados do ambiente *in vivo*. Um dos mecanismos bastante comum com tal finalidade é o resfriamento dos tecidos animais, sendo assim, este método busca reduzir a temperatura tecidual. Por conseguinte a quantidade e a velocidade das reações químicas na amostra tecidual serão diminuídas, caindo o metabolismo celular, e assim, o consumo energético, retardando os processos degenerativos. Por essa razão, pode-se dizer que os principais objetivos do resfriamento é auxiliar o manejo laboratorial vinculado a processos de cultivo *in vitro*, sem falar na possibilidade de criação de um protocolo de transporte dos ovários do local de coleta até os laboratórios especializados.

Referente ao tecido ovariano, em geral, os pesquisadores optam em estocar a 4°C ou 20°C para a preservação da morfologia normal de folículos ovarianos pré-antrais de ovelhas (Andrade et al., 2001; Matos et al., 2004), cabras (Silva et al., 2000; Carvalho et al., 2001; Ferreira et al., 2001) e vacas (Lucci et al., 2004).

Em ovelhas, Matos et al. (2004) revelaram que, pela análise histológica a integridade dos folículos primordiais foi mantida nos fragmentos estocados a 20°C por até 24 horas, no entanto, pela análise ultra-estrutural, apenas folículos primordiais estocados a 4°C por até 24 horas, a 20°C por até 12 hs em solução salina ou em TCM 199 se apresentaram normais.

Já nas cabras Carvalho et al. (2001) concluíram que, pela análise ultra-estrutural, folículos pré-antrais podem ser estocados com sucesso *in situ* a 4°C em solução salina ou em Braun-Collins por até 12 horas. Em outro estudo também com cabras, a análise histológica mostrou que o estoque de fragmentos ovarianos nas soluções de M199 e M199IAA a 20°C reduziu estatisticamente a porcentagem de folículos pré-antrais normais quando comparados com o controle, exceto no tratamento após a preservação em M199IAA a 20°C por 4 horas. Em contraste, a preservação a 4°C em ambas as soluções manteve a porcentagem de folículos pré-antrais normais comparada ao controle. Sendo assim a adição do IAA (Índole-3-Acetic Acid) no TCM 199

foi eficiente para a preservação de folículos pré-antrais de cabras a 20 °C por 4 horas (Ferreira et al., 2001).

Lucci et al. (2004) observaram que ovários de vacas zebuínas puderam ser estocados com sucesso a 4 °C por até 18 horas sem danos morfológicos dos folículos pré-antrais. No entanto, a 20 °C os ovários puderam ser estocados por apenas 6 horas.

Em suínos, Lucci et al. (2007) relataram que, segundo análise histológica, o estoque de ovários a 4 °C e 20 °C por até 18hs não afetou a morfologia de folículos primordiais, e o estoque a 4 °C por até 18hs ou a 20 °C por até 6hs não afetou a morfologia dos folículos em crescimento e sua habilidade em crescer *in vitro*.

### **Métodos de Avaliação de FOPA**

Após o período de resfriamento, é necessário avaliar e analisar o grau de comprometimento da viabilidade do tecido em questão resfriado. Existem algumas maneiras para tal fim, dentre elas, o cultivo *in vitro* do material resfriado e sua análise por Microscópio. O cultivo *in vitro* da amostra já resfriada tende a fornecer todas as características ovarianas *in vivo*, no que tange a temperatura, gases, pH, ausência de luz, nutrientes, dentre outros. Sendo assim, é de se esperar que o tecido já resfriado seja capaz, após o cultivo *in vitro*, de expressar provavelmente possíveis danos consumados durante o resfriamento.

Pela análise por microscopia eletrônica de transmissão, Van den Hurk et al. (1998) sugerem que as condições ultra-estruturais de ovócitos bovinos pré-antrais grandes (140-450 µm) melhoraram durante o cultivo *in vitro*, o que não foi observado nos folículos pequenos (40-100 µm).

Sabe-se que a análise quantitativa (microscopia de luz) pode fornecer uma idéia de proporções, ou seja, a grande vantagem é a observação da quantidade de determinada característica em comparação com o total. Caso seja necessária uma análise mais minuciosa, a microscopia de luz peca pela baixa oferta de detalhes do material analisado, pois o poder de resolução é baixo. No tocante à da microscopia eletrônica de transmissão (MET), o poder de resolução é mil vezes superior ao da microscopia de luz. Por esta razão, é natural o uso dessa técnica para análises minuciosas. No entanto a MET não

fornece noções de proporções ou porcentagens dado o pequeno número de amostras analisadas.

Dessa maneira, a técnica mais adequadamente empregada é aquela que busca associar ambas análises de microscopia (de luz e eletrônica de transmissão), abrangendo todas as vantagens dos dois métodos.

Além disso, a análise por microscopia eletrônica de transmissão pode mostrar resultados diferentes da microscopia de luz. Por exemplo, nos estudos de Silva et al. (2000) e Carvalho et al. (2001) a microscopia de luz mostrou que folículos pré-antrais de cabras foram morfológicamente normais após 24 hs estocados a 4°C. Contudo, a microscopia eletrônica de transmissão revelou que folículos pré-antrais foram normais apenas até 12hs sob a mesma temperatura.

## Justificativa

No que se refere ao resfriamento de folículos pré-antrais suínos, existe um único trabalho (Lucci et al., 2007). No entanto, este trabalho utilizou somente microscopia de luz para avaliar os FOPA, e não foi feita análise ultra-estrutural.

Além disso, em suínos, pesquisadores demonstraram que ovócitos recolhidos de folículos antrais não sobrevivem ao resfriamento a 15°C ou abaixo disso (Didion et al., 1990). Dessa forma, os ovócitos de folículos pré-antrais suínos podem ser mais resistentes às condições adversas.

Várias características foram descritas, demonstrando que os folículos pré-antrais (mais especificamente, os primordiais) são menos vulneráveis às injúrias decorrentes da criopreservação do que folículos com ovócitos maduros ou no estágio de M II. Entre essas características estão: o tamanho reduzido tanto do ovócito quanto das células foliculares, com baixo volume de água, que conseqüentemente significa baixa quantidade de cristais de gelo; o baixo metabolismo celular; o estágio do ciclo celular, com núcleo em vesícula germinativa e não com fuso meiótico, como no caso dos ovócitos em M II; a ausência de zona pelúcida e grânulos da cortical; e uma menor quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos sensíveis ao frio. Além disso a coleta de folículos primordiais pode ser feita em qualquer fêmea, independente da idade, estágio do ciclo estral e mesmo em animais recém-mortos, sendo um excelente método para armazenar um grande número de ovócitos de uma fêmea (Shaw et al., 2000a; Oktay et al., 2000; Shaw et al., 2000b).

Desta forma, mais estudos sobre o resfriamento de ovócitos de FOPA suínos são necessários. Estes estudos podem abrir novas possibilidades de conservação de células germinativas femininas em suínos, os quais poderão ser aplicadas a espécies domesticadas e selvagens.

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral:**

- Testar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de conservação sobre a morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais suínos.

### **Objetivos Específicos:**

- Verificar a sensibilidade ao frio dos ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais suínos;
- Avaliar o efeito das baixas temperaturas sobre a morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais, antes e depois de um período de cultivo *in vitro*, quantitativamente através de análise histológica, e qualitativamente através da análise ultra-estrutural.
- Criar um protocolo eficiente de transporte de ovários suínos até os laboratórios especializados ou bancos de germoplasma.

## Referências Bibliográficas

Adams, G.P; Matteri, R.L; Kastelic, J.P; Ko, J.C.H; Ginther, O.J. Association between surges of folliclestimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, 94, 177-188, 1992.

Amorim, C.A; Rodrigues, A.P.R; Lucci, C.M; Figueiredo, J.R.; Gonçalves, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Rum. Res.**, 37, 269-277, 2000.

Andrade, E.R; Rodrigues, A.P; Amorim, C.A; Carvalho, F.C; Dode, M.A; Figueiredo, J.R. Short term maintenance of sheep preantral follicles *in situ* in 0.9% saline and Braun-Collins solution. **Small Rum. Res.**, 41, 141-149, 2001.

Beckers, F.J; Drion, P.V; Figueiredo, J.R., et al. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reprod. Dom. Anim.**, 31, 543-548, 1996.

Bolamba, D; Russ, K.D; Olson, M.A; Sandler, J.L; Durrant, B.S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, 58, 1689-1703, 2002.

Braw-tal, R and Yossefi, S; Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in bovine ovary. **J. Reprod. Fertil**, 109, 65-171,1997.

Buccione, R; Schroeder, A.C; Eppig, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol. Reprod.** 43, 543-547, 1990.

Carámbula, S.F; Gonçalves, P.B.D; Figueiredo, J.R; *et al.* Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, 24, 235, 1996.

Carrol, J; Wood, M. J; Whittinghan, D. J; Telfer, E; Gosden, R. G; Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **J. Reprod. Fertil.**, 90, 321-327, 1990.

Carrol, J; Wood, M. J; Whittinghan, D. J; Normal fertitization and development of frozen-thawed mouse oocytes: Protective Action of certain macromolecules. **Biol. Reprod.**, 48, 606-612, 1993.

Carvalho, F.C.A; Lucci, C.M.; Silva, J.R.V; Andrade, E.R; Bão, S.N; Figueiredo, J.R; Effect of Braun-Collins and Saline solution at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved *in situ*. **Anim. Reprod. Sci.** 66, 195-208, 2001.

Cunningham, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Ed: Guanabara Koogan, 2004. 579 p.

Didion, B.A; Pomp, D; Martin, M.J; Homanics, G.E; Markert, C.L; Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **J. Anim. Sci.**, 68, 2803-2810, 1990.

Eppig, J. J; Analisis of mouse oogenesis *in vitro*. Oocyte isolation in the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. **J. Exp. Zool.**, 198, 375-382, 1976.

Eppig, J. J and O'Brien, M. J; Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol. Reprod.** 54, 197-207, 1996.

Eppig, J. J and Schroeder, A. C; capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. **Biol. Reprod.** 41, 268-276, 1989.

Ericsson, G.F. Analysis of follicle development and ovum maturation. In: **Semin Reprod Endocrinol**, 4, 233-254, 1986.

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 ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology** 55, 1607-1617, 2001.

Figueiredo, J. R., Hulshof, S. C. J., Van Den Hurk, R., Ectors, F. J., Fontes, R. S., Nusgens, B., Bevers, M. M., Beckers, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, 40, 789-799, 1993.

Figueiredo, J. R; Rodrigues, A. P. R; Amorim, C. A; Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves, P. B. D; Figueiredo, J. R; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, Varela Editora e Livraria LTDA, 2002. p. 227-260.

Fortune J.E, Rivera G.M., Evans A.C.O., Turzillo A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, 65, 648-654, 2001.

Gosden R,G; Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 163, 125-129, 2000.

Greenwald, G. S and Moor, R. M; Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **J. Reprod. Fertil.** 87, 561-571, 1989.

Gupta, P.S.P., Nandi, S., Ravindranatha, B.M., Sarma, P.V; Isolation of preantral follicles from buffalo ovaries. **Vet. Rec.** 148, 543-544, 2001.

Gupta, P.S.P; Nandi, S.; Ravindranatha, B.M.; Sarma, P.V. *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **Theriogenology**, 57, 1839-1854, 2002.

Gupta, P.S.P; Ramesh, H.S; Manjunatha, B.M; Nandi, S; Ravindr, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, 16, 57–63, 2008.

Gutierrez, C. G; Ralph, J. H; Telfer, E. E; Wilmut, I; Webb, R; Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term of culture *in vitro*. **Biol. Reprod.** 62, 1322-1328, 2000.

Hafez, E. S. E; Jainudeen, M. R; Rosnina, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In Hafez, E.S.E. and Hafez, B. **Reprodução Animal**. Ed: Manole, 2004. p. 33-54.

Hafez, E. S. E. and Hafez, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In Hafez, E.S.E. and Hafez, B. **Reprodução Animal**. Ed: Manole, 2004. p. 69-82.

Hirao, Y; Nagai, T; Kubo, M; Miyano, T; Miyake, M; Kato, S; *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 100, 333-339, 1994.

Hirshfield, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **Intern rev cytol**, 124, 43-101,1991.

Hulshof, S. C. J; Figueiredo, J. R; Beckers, J. F; Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovines ovaries. **Vet. Quart.**, 16, 78-80, 1994.

Lazzari, G; Galli, C; Moor, R. M; Centrifugal Elutriation of porcine oocytes isolated from the ovaries of newborn piglets. **Anal. Bioch.** 200, 31-35, 1992.

Lucci, C. M; Amorim, C. A; Bão, S. N; Figueiredo, J. R; Rodrigues, A. P. R; Silva, J. R. V; Gonçalves, P. B. D; Effect of the intervalo f serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, 56, 39-49, 1999.

Lucci, C.M; Kacinskis, M.A; Rumpf, R; Bão, S.N; Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos Indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology** 61, 461-472, 2004.

Lucci, C.M; Schreier, L.L; Machado, G.M; Amorim, C.A; Bão, S.N; Dobrinsky, J.R; Effects of storing pig oocytes at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. **Reprod. Dom. Anim.** 42, 76-82, 2007.

Matos, M.H.T; Andrade, E.R; Lucci, C.M; Bão, S.N; Silva, J.R.V; Santos, R.R; Ferreira, M.A.L; Costa, S.H.F; Celestino, J.J.H; Figueiredo, J.R; Morphology and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology** 62, 65-80, 2004.

Matos, M. H. T; Van den Hurk, R; Lima-Verde, I. B; Luque, M. C. A; Santos, K. D. B; Martins, F. S; Bão, S. N; Lucci, C. M; Figueiredo, J. R; Effects of Fibroblast Growth Factor-2 on the *in vitro* Culture of Caprine Preantral Follicles. **Cells Tissues Organs**; 186,112-120, 2007.

Nuttinck, F; Mermillod, P; Massip, A; Dessy, F. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, 39, 811-821, 1993.

Oktaý K; Karlikaya G.G; Aydin B.A. Ovarian cryopreservation and transplantation: basic aspects. **Mol. Cell. Endocrinol.** 169, 105–108, 2000.

Roy, S.K; Greenwald, G.S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. **Biol. Reprod.**, 32, 203-215, 1985.

Roy, S.K; Treacy, B.J. Isolation and long term culture of human preantral follicles. **Fertil. Steril.**, 59, 783-790, 1993.

Shaw J. M., Oranratnachai A., Trounson A.O. Fundamental Cryobiology of Mammalian Oocytes and Ovarian Tissue. **Theriogenology** 53, 59-72, 2000a.

Shaw J.M.; Cox, S-L; Trounson A.O.; Jenkin G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Mol. Cell. Endocrinol.** 161, 103–110, 2000b.

Silva, J. R. V; Lucci, C. M; Carvalho, F. C. A; Bao, S. N; Costa, S. H. F; Santos, R. R; Figueiredo, J. R; Effect of Coconut Water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubations times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. **Theriogenology** 54, 809-822, 2000.

Telfer, E.E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. **Theriogenology**, 45, 101-110, 1996.

Telfer, E.E.; Binnie, J.P.; McCaffery, F.H.; Campbell, B.K. *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles, **Mol. Cell. Endocrinol.**, 163, 117-123, 2000.

Telfer, E. E; *In vitro* development of pig pre-antral follicles. **Reprod.** 58, 81-90, 2001. (suppl.)

Torrance, C; Telfer, E.E; Gosden, R.G. Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. **J. Reprod. Fertil.** 87, 367-374, 1989.

Van den Hurk, R; Spek, E. R; Hage, W. J; Fair, T; Ralph, J. H; Schotanus, K; Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reprod Update**, 4, 833-841, 1998.

Wandji, S.A; Eppig, J.J; Fortune, J.E. FSH and growth factors affect the growth and the endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, 45, 817-832, 1996.

Wu, J; Emery, B, R; Carrel, D, T; *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol. Reprod.** 64, 375-381, 2001.

## CAPÍTULO ÚNICO

### EFFECTS OF LOW TEMPERATURE MAINTENANCE OF OVARIES ON THE MORPHOLOGY OF PIG PRIMORDIAL FOLLICLES: AN ULTRASTRUCTURAL APPROACH

Animal Reproduction Science

Brito, R.C.B.<sup>1</sup>; Borges, E.N.<sup>2</sup>; Silva, R.C.<sup>2</sup>; Amorim, C.A.<sup>2</sup>; Bão, S.N.<sup>2</sup>; Lucci,  
C.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília-DF;

<sup>2</sup> Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade de folículos primordiais suínos após período de hipotermia com ou sem cultivo *in vitro*. A baixa temperatura tem sido usada para reduzir o metabolismo celular e minimizar a degradação tecidual. Foram utilizados 4 ovários de 4 animais pré-púberes oriundos de abatedouro. Como controle, pedaços de córtex ovariano foram fixados no abatedouro (Controle Abate) e no momento em que chegaram ao laboratório (Controle Lab). Como controle do cultivo, pedaços de córtex foram destinados ao cultivo *in vitro* assim que chegaram ao laboratório (Controle CIV). Os ovários foram transportados ao laboratório a 36-38°C em aproximadamente 1 hora. No laboratório, pedaços de córtex ovariano foram dissecados e mantidos em solução salina estéril a 4°C ou 20°C por 6, 12 ou 18hs. Após o resfriamento de todas as amostras, em cada tratamento houve um fragmento do córtex que foi fixado e outro que foi submetido ao cultivo *in vitro* por duas horas e então fixado posteriormente. O cultivo *in vitro* foi realizado utilizando meio Waymouth suplementado com piruvato, glutamina, ITS, ácido ascórbico, antibióticos e soro fetal bovino, a 38°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. A finalidade do cultivo *in vitro* de curta duração é somente restabelecer a temperatura e o metabolismo celular (não havendo a intenção de promover crescimento), para que as células possam expressar morfolologicamente possíveis danos moleculares que tenham sofrido durante o tratamento. Após a fixação, todas as amostras foram preparadas para histologia. Somente os folículos primordiais foram contados e classificados como morfolologicamente normais (FMN) ou degenerados. Os tratamentos foram comparados entre si por ANOVA e teste de Scheffe's. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) sob análise de microscopia de luz. É possível preservar ovários suínos a 4°C ou 20°C por até 18h, mantendo alta porcentagem de folículos primordiais morfolologicamente normais (FMN). Na maioria dos tratamentos pode ser notada uma tendência em aumentar a porcentagem de FMN quando o cultivo *in vitro* foi realizado. O cultivo *in vitro* não mostrou danos submorfológicos que poderiam ter sido causados durante o período de resfriamento. Os resultados ultra-estruturais mostram que folículos primordiais em tecido ovariano mantido a 4°C ou 20°C por 18hs não apresentaram alterações que comprometam a

viabilidade destes. Além disso, os tratamentos cultivados *in vitro* por 2hs mostraram melhorar a integridade celular dos folículos primordiais suínos.

Palavras chaves: Viabilidade, cultivo *in vitro*, ultra-estrutura.

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to evaluate the viability of pig primordial follicles after low temperature maintenance. Four ovaries from 4 gilts collected at a local slaughterhouse were used. As controls, samples of ovarian cortex were fixed at the slaughterhouse (slaughter control) and as soon as they got to the laboratory (LAB control). Also, fresh cortex samples were placed in *in vitro* culture (CIV control). The ovaries were transported to the Lab at 36-38°C within 1 hour. In the Lab, samples of ovarian cortex were dissected and maintained in sterile saline solution at 4 °C or 20 °C for 6h, 12h or 18h. After the incubation time of all treatments, one sample of each treatment was fixed and another was placed in *in vitro* culture for 2h and then fixed. The *in vitro* culture was performed using Waymouth medium supplemented with pyruvic acid, glutamine, ITS, ascorbic acid, antibiotics and fetal calf serum, at 38 °C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air. The aim of this short *in vitro* culture was only return the tissues to their normal temperature and metabolism (there was no intention to promote growth). This way, the cells could morphologically express molecular damage that could have occurred during the cooling. After fixation, all samples were processed for histology. Only primordial follicles were counted and classified as morphologically normal (FMN) or degenerated. Treatments were compared among each other using ANOVA and Scheffe's test. No significant difference was observed among treatments ( $P>0.05$ ) under the light microscopy analysis. It is possible to preserve pig ovaries at 4°C or 20°C for up to 18h, keeping a high percentage of morphologically normal primordial follicles. The most treatments a tendency to improve the percentage of FMN could be noted when *in vitro* culture was performed. The *in vitro* culture did not show submorphological damage that could be caused during low temperature preservation. Our results ultrastructural indicate that the treatments *in vitro* cultured for 2h showed better conditions viability and cellular integrity of pig primordial follicles.

Key words: viability, *in vitro* culture, ultrastructural.

## INTRODUÇÃO

Processos de resfriamento têm sido estudados como métodos de conservação em curto prazo, consistindo na diminuição da temperatura do tecido, na tentativa de reduzir o metabolismo e retardar os processos de degeneração celular. Este tipo de conservação tem grande importância para o transporte de ovários do local de coleta até os laboratórios especializados. Apesar de trabalhos neste sentido já terem sido realizados em diferentes espécies domésticas, não existem relatos a respeito do resfriamento de tecido ovariano para suínos.

A conservação pelo resfriamento de ovócitos em estágio de vesícula germinativa pode gerar uma fonte útil e vantajosa de material genético para pesquisas científicas e permitir experimentos serem realizados em tempo convenientes. Desta forma, o procedimento de resfriamento auxilia na elaboração e capacitação de bancos de germoplasma animal, principalmente em tecidos suínos por apresentar grande sensibilidade ao frio, responsável pela preservação de material genético de gametas criopreservados com ênfase em linhagens de produção melhoradas geneticamente ou em linhagens ameaçadas de extinção.

Sendo assim, os ovários suínos contêm uma reserva de milhares de folículos primordiais, correspondendo a cerca de 95% de toda a população folicular (Erickson, 1986), por essa razão é considerado com uma valioso fonte para estudos (Carroll and Gosden, 1993). Os folículos primordiais apresentam o ovócito cercado por uma camada de células da granulosa achatadas ou cúbicas-achatadas.

Recentemente, muita atenção tem sido dada à preservação de ovócitos em curto período em baixa temperatura. Esta técnica é especialmente importante para o transporte de ovários, principalmente no caso de fazendas ou em animais selvagens cujo ovário doador se encontra afastado dos laboratórios especializados. Técnicas para o estoque a baixas temperaturas foram desenvolvidas para cabras (Silva et al., 2001; Carvalho et al., 2001), ovelhas (Andrade et al., 2002) e vacas (Lucci et al., 2004). Nesses estudos, as temperaturas de 4 e 20°C foram testadas para a preservação dos folículos pré-antrais.

Em suínos, sabe-se que os ovócitos são mais sensíveis ao resfriamento, principalmente abaixo de 15°C (Didion et al., 1990). Desta forma, a sensibilidade ao resfriamento é atribuída a grande quantidade de lipídeo dos ovócitos suínos (Mc Evoy et al., 2000), e a tolerância a baixas temperaturas é obtida quando seu conteúdo lipídico é removido, entretanto, sabe-se que os lipídios intracelulares são uma fonte fundamental de energia ao ovócito, além de serem constituintes estruturais para as membranas celulares, portanto, sua remoção provavelmente comprometerá o desenvolvimento do ovócito (Nagashima et al., 1994)

Contudo, esses trabalhos foram realizados com ovócitos de folículos antrais. Sabe-se que esses possuem um maior conteúdo lipídico intracitoplasmático comparado aos ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (Shaw et al., 2000). Devido a esse baixo conteúdo lipídico, associado ao seu pequeno tamanho, pobre diferenciação e baixo metabolismo, ovócitos de folículos pré-antrais podem ser mais tolerantes a processos hipotérmicos comparados aos ovócitos de folículos antrais (Gosden, 2000).

Recentemente, um estudo mostrou que folículos primordiais suínos parecem ser bem preservados por até 18hs a 4 e 20°C (Lucci et al., 2007). Neste estudo, porém, a investigação ultra-estrutural não foi feita. Alguns autores tem enfatizado a importância da avaliação ultra-estrutural após a preservação *in vitro* de folículos pré-antrais, histologicamente folículos normais podem ter mudanças degenerativas detectadas apenas com microscopia eletrônica (Silva et al., 2001). Paynter et al (1999) sugerem que o processo de reaquecimento de tecido criopreservado em ambiente rico em nutrientes permite o restabelecimento da atividade metabólica das células foliculares, volume celular normal e contato íntimo célula-célula.

A meta do presente estudo foi avaliar a morfologia e ultra-estrutura de folículos primordiais suínos em baixas temperaturas, antes e após o cultivo *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos ovários e dinâmica experimental

Ovários suínos (n = 4) de animais pré-púberes (Figura 1) foram coletados em abatedouros locais, lavados com álcool a 70% durante dez segundos e então enxaguados três vezes em solução salina 0.9% e transportados ao laboratório a 38-39°C por volta de 1h.

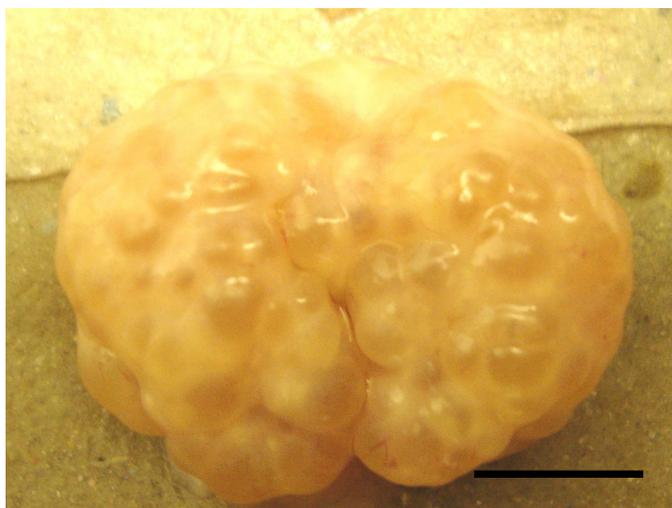


Figura 1. Exemplo de ovário suíno pré-púbere. Barra = 1cm.

Para testar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de preservação na conservação de folículos primordiais suínos, de cada ovário foram retirados 15 fragmentos do córtex de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Como controle, pedaços do córtex foram fixados no abatedouro (Controle Abate) e no momento em que chegaram ao laboratório (Controle Lab). Como controle do cultivo, pedaços de córtex foram destinados ao cultivo *in vitro* assim que chegaram ao laboratório (controle Civ). Os outros 12 fragmentos foram destinados (dois a dois) a 6 tratamentos de resfriamento, descritos a seguir. Em todos os tratamentos, o tecido ovariano foi mantido em solução salina (0,9%) tamponada e estéril.

Foram testadas 2 temperaturas (4°C e 20°C) e 3 tempos de resfriamento (6, 12 e 18 horas), perfazendo assim os 6 tratamentos. Após o período de resfriamento um dos fragmentos de tecido ovariano (total = 6 amostras) foi imediatamente fixado. A outra amostra foi submetida a 2 horas de cultivo *in vitro*, como será descrito a seguir. Tal cultivo visa fazer com que o tecido

retorne à sua temperatura e metabolismo normais após o resfriamento. Após este período, o material foi então processado para análise histológica e ultra-estrutural. De cada uma das amostras, foi retirado um pequeno fragmento, que foi processado para microscopia eletrônica de transmissão. O restante do tecido foi processado para análise histológica.

Segue esquema de execução do resfriamento na figura 2.

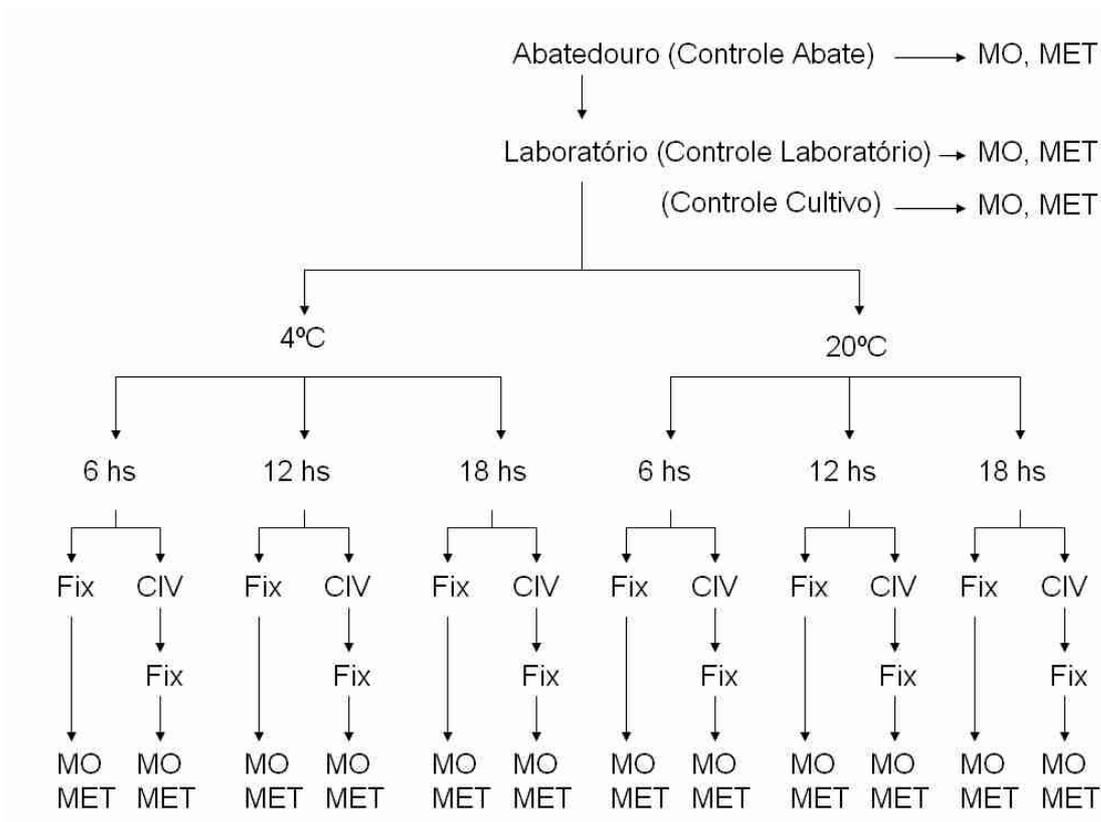


Figura 2. Seqüência do procedimento de resfriamento de pedaços do córtex ovariano suíno, MO- microscopia óptica e MET- microscopia eletrônica de transmissão.

### Microscopia de luz

As amostras de tecido processadas para análise histológica foram fixadas em Carnoy por 3 hs. Após fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol, embebidos em parafina (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany), e seccionados à espessura de 5µm. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas ao MO (Oberkochen, Gemany).

Apenas folículos primordiais com núcleo visível foram contados e classificados como morfológicamente normais ou degenerados de acordo com a aparência morfológica. Folículos foram considerados degenerados quando apresentaram corpos picnóticos nas células da granulosa, núcleo ovocitário condensado, grandes vesículas no citoplasma do ovócito ou baixa densidade celular.

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

Para a análise ultra-estrutural, os pequenos fragmentos do córtex (cerca de 1 mm<sup>2</sup>) de tecido ovariano foram fixados em solução de glutaraldeído (2,5% em 0,1M) e paraformaldeído (2%) em tampão cacodilato de sódio (pH 7,3 em 0,1M), pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%), ferricianeto de potássio (0,8%) e 5mM de cloreto de cálcio. As amostras foram desidratadas em acetona e incluídas em resina Spurr. Cortes semi-finos (3µm) foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio óptico para localização prévia dos folículos. Os cortes ultra-finos (70nm) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan). Apenas FMN observados nos cortes semi-finos foram ultra-estruturalmente avaliados. Os folículos observados foram analisados e avaliados em função à aparência geral, aspecto geral do citoplasma, quantidade, tamanho e distribuição das organelas citoplasmáticas do ovócito e da granulosa bem como das gotas de lipídeo, da silhueta e da eletrodensidade de tais gotas, do contorno e integridade das membranas plasmáticas, basais e nucleares das células que compõem o folículo ovariano primordial suíno e da freqüência de associação entre organelas e estruturas do citoplasma.

Só foram analisados pela microscopia eletrônica de transmissão os tratamentos que obtiveram melhores resultados e maior tempo de conservação.

### **Procedimento de cultivo *in vitro***

Para o cultivo *in vitro*, os fragmentos ovarianos foram incubados em uma placa de 4 poços (Nunc, Roskild, Denmark) por 2 hs em 1mL de meio de

cultura. As placas foram mantidas a 38°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de cultivo consistia de Waymouth MB suplementado com 0,23 mM ácido pirúvico, 2 mM L-glutamina, 6,25 µg/mL insulina, 6,25 µg/mL transferrina e 6,25 ng/mL selênio (ITS), 100µg/mL L-ácido ascórbico, 100 µg/mL penicilina, 50 µg/mL streptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e 5% soro fetal bovino. A finalidade do cultivo *in vitro* de curta duração é somente restabelecer a temperatura e o metabolismo celular do tecido em questão (não havendo a intenção de promover crescimento), para que as células possam expressar morfologicamente possíveis danos moleculares que podem ter sofrido durante o resfriamento.

### **Análise Estatística**

Os dados foram analisados pela ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Scheffe (StatView for Windows, SAS Intitute Inc., Cary, NC, USA). Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Microscopia de luz**

Um total de 913 folículos primordiais foram analisados pela microscopia de luz. Exemplos de FMN são mostrados na figura 3.

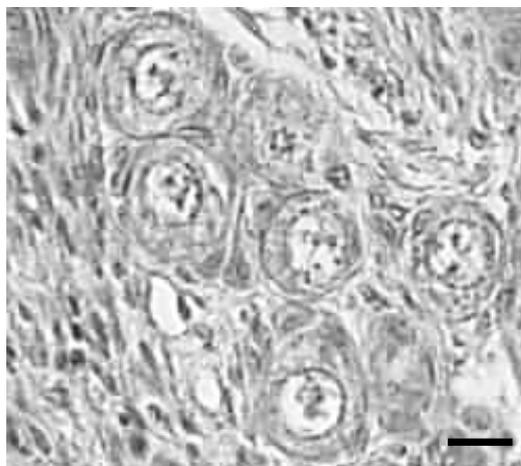


Figura 3. Folículos Primordiais suínos morfologicamente normais do Controle Abate. Barra = 15 µm.

As percentagens dos FMN nos controlos e nos diferentes tratamentos estão presentes na figura 4. As médias seguidas do desvio padrão de folículos primordiais morfologicamente normais foram de  $90,0 \pm 7,5$  para o Controle Abate e  $90,8 \pm 18,3$  no Controle Laboratório. Não houve diferença significativa entre estes dois controlos, mostrando que o transporte nas condições realizadas não afeta a taxa de FMN. O Controle Cultivo apresentou  $79,4 \pm 22,2$  FMN, e também não diferiu dos outros controlos ( $P > 0,05$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) sob análise de microscopia de luz. Entretanto, na maioria dos tratamentos uma tendência em aumentar a percentagem de FMN (colunas escuras) pode ser notada após o cultivo *in vitro* (Figura 4). As médias dos FMN ( $\pm DP$ ) nos 6 tratamentos antes e após o cultivo *in vitro* estão apresentadas na tabela 1.

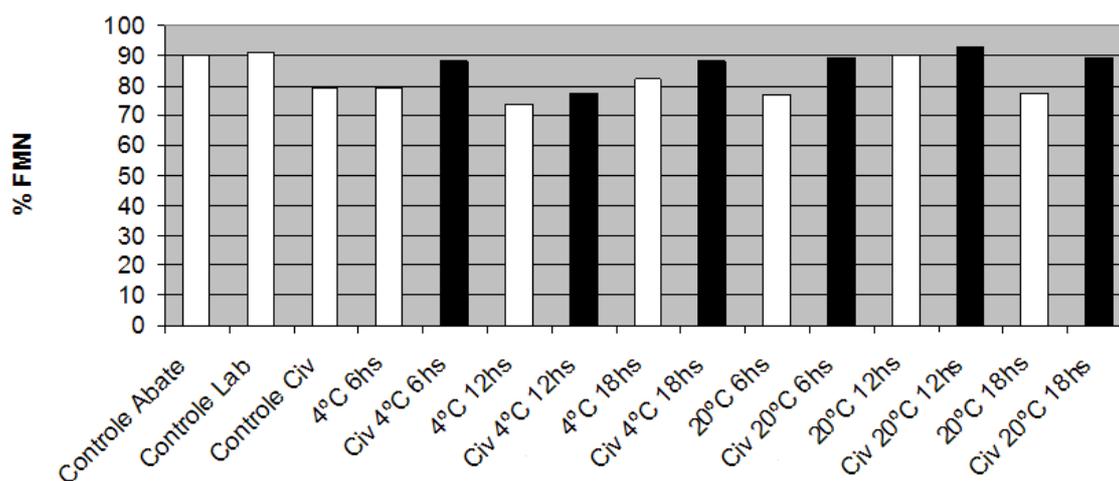


Figura 4. Percentagem de FMN (Folículos Morfologicamente Normais) nos controlos e nos 6 tratamentos antes e depois do Civ (Cultivo *in vitro*).

Tratamentos		% FMN ( $\pm DP$ )	
Temperatura	Tempo	Antes CIV	Após CIV
4°C	6hs	$79.2 \pm 13.9$	$87.8 \pm 7.7$
4°C	12hs	$73.8 \pm 4.3$	$77.5 \pm 7.9$
4°C	18hs	$82.3 \pm 9.0$	$87.8 \pm 10.7$
20°C	6hs	$77.0 \pm 11.4$	$89.2 \pm 7.3$
20°C	12hs	$89.8 \pm 5.7$	$93.0 \pm 5.2$
20°C	18hs	$77.3 \pm 7.8$	$89.1 \pm 10.6$

Tabela 1. Percentagem de FMN (Folículos Morfologicamente Normais) seguidas dos desvios padrões ( $\pm DP$ ) na conservação dos tratamentos antes e depois do CIV (Cultivo *in vitro*).

O principal tipo observado e sua frequência em todos os tratamentos juntos, antes e depois do cultivo *in vitro* foram, respectivamente, núcleo picnótico (35/484; 28/429), ovócito degenerado (26/484; 18/429) e folículo totalmente degenerado (17/484; 4/429). Estes tipos de degeneração estão presentes na figura 5.

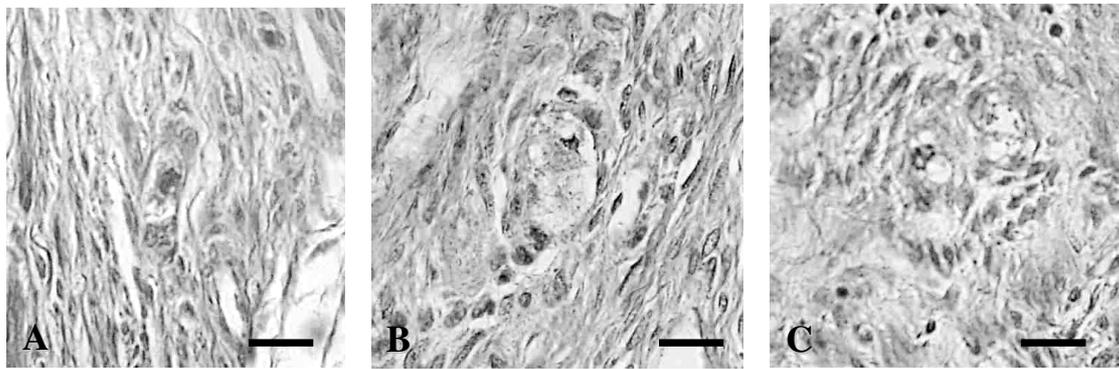


Figura 5. Folículos Primordiais Degenerados. A) Núcleo picnótico, B) Ovócito degenerado e C) Folículo totalmente degenerado. Barra = 15 µm.

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão, características do ovócito e das células da granulosa, suas organelas, membranas nucleares, plasmáticas, basais foram observados. Apenas folículos que foram morfológicamente normais nos cortes semi-finos foram avaliados ultra estruturalmente.

### **Controle abatedouro (Fresco) e lab.**

Os folículos primordiais suínos morfológicamente normais nos controles Abate e Lab apresentaram ovócito redondo a ovalar com seu núcleo geralmente redondo munido de cromatina lisa em sua maioria e muitas vezes com nucléolo evidente (Figura 6). O citoplasma do ovócito sempre mostrou uma delicada granulação e distribuição homogênea de suas organelas. A maioria das mitocôndrias estava redonda a oval, geralmente com eletrodensidade similar a do citosol. Poucas vesículas e cisternas de retículo endoplasmático rugoso foram vistas. O retículo endoplasmático liso foi mais freqüente comparado ao rugoso. Gotas de lipídio foram vistas em pequenos grupos e geralmente em tamanho pequeno. Membranas nuclear e plasmática estavam intactas e bem torneadas. As células da granulosa (Figura 6)

apresentaram um núcleo achatado com muitas partes de cromatina condensada. Várias cisternas de retículo endoplasmático liso e rugoso estavam presentes. A maioria das mitocôndrias eram alongadas e pequenas. As gotas de lipídeo também puderam ser vistas na granulosa. Um íntimo contato entre o ovócito e as células da granulosa foi mantido por muitas microvilosidades paralelas à superfície do ovócito (Figura 7)

### Resfriamento sem cultivo

Os folículos analisados nos tratamentos de resfriamento foram em geral semelhantes aos dos controles. Os ovócitos dos folículos resfriados a 4°C por 18 hs apresentaram mitocôndrias levemente inchadas, poucas cisternas do retículo endoplasmático liso e alguns espaços vazios em seu citoplasma, lembrando “rachaduras”. Tais estruturas variaram de grau médio a alto, algumas contornadas com membrana, outras não (Figura 8). Tal característica foi observada também no grupo Controle Fresco, apesar de que em menor intensidade.

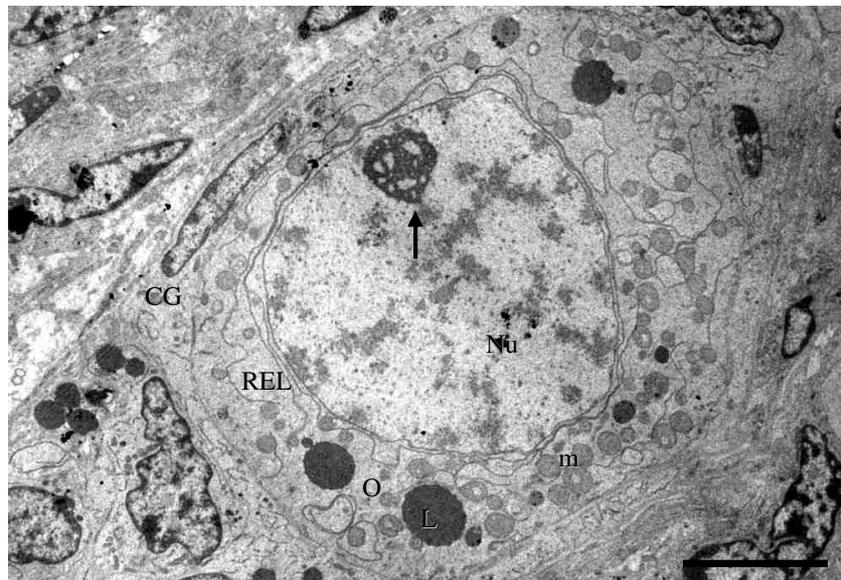


Figura 6. Folículo primordial suíno do grupo controle abate. O: ovócito, CG: Célula da granulosa, Nu: núcleo (seta nucléolo), L: Gota de lipídeo, m: mitocôndria, REL: retículo endoplasmático liso, Barra = 5 µm.

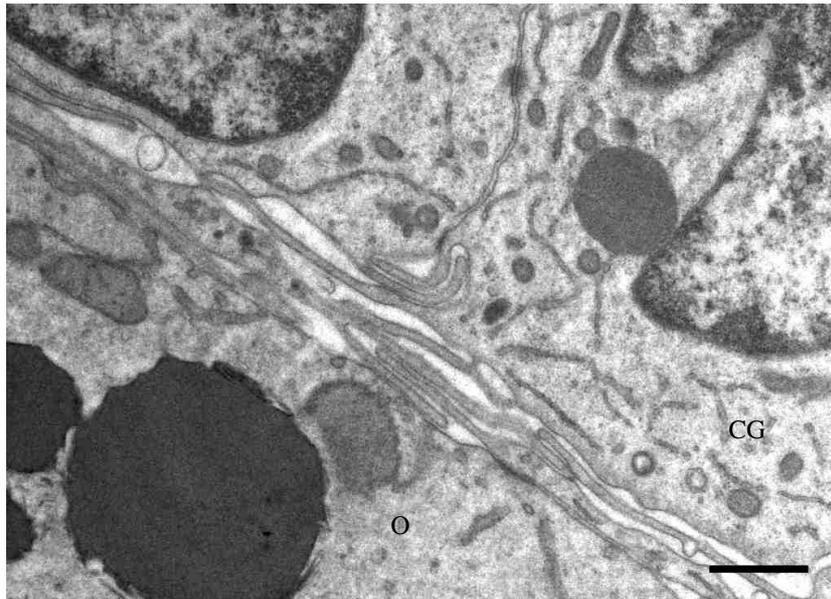


Figura 7. Citoplasma do ovócito (O) e citoplasma da célula da granulosa (CG) de um folículo primordial suíno. Células da granulosa apresentam menores organelas que o ovócito. Note as microvilosidades que conectam os dois tipos de células. Barra = 1  $\mu$ m.

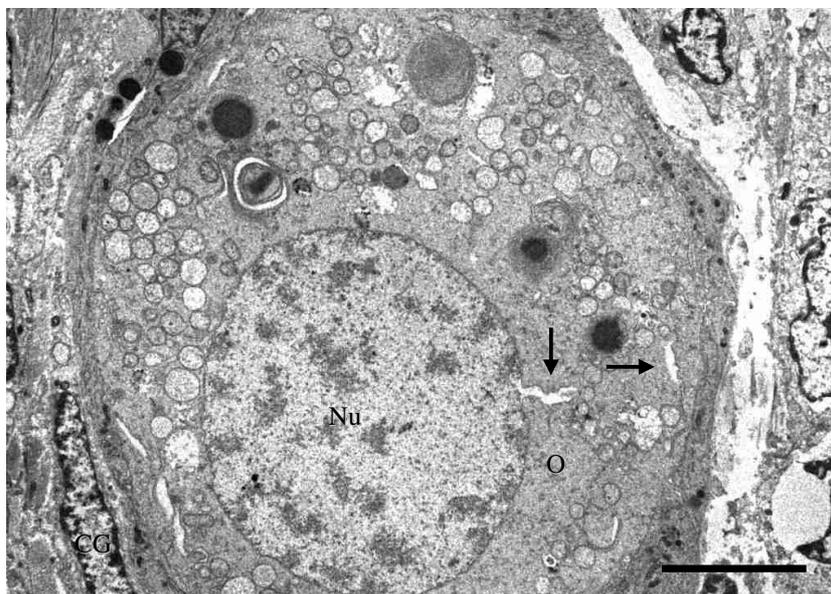


Figura 8. Folículo mantido a 4<sup>o</sup>C por 18 hs. O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo. Note as “rachaduras” no citoplasma (seta). Barra = 5  $\mu$ m.

Nos folículos resfriados a 20°C por 18h analisados houve a uma tendência de agrupamento das organelas na região perinuclear, formando assim, regiões despovoadas à margem do citosol (Figura 9). Além disso, em alguns casos houve uma leve deformação do contorno do ovócito. Foram observados alguns vacúolos no citosol do ovócito. A granulação do citosol dos ovócitos se apresentou um pouco menos delicada que a dos controles, formando pequenos grumos difusos em todo o citosol do ovócito.

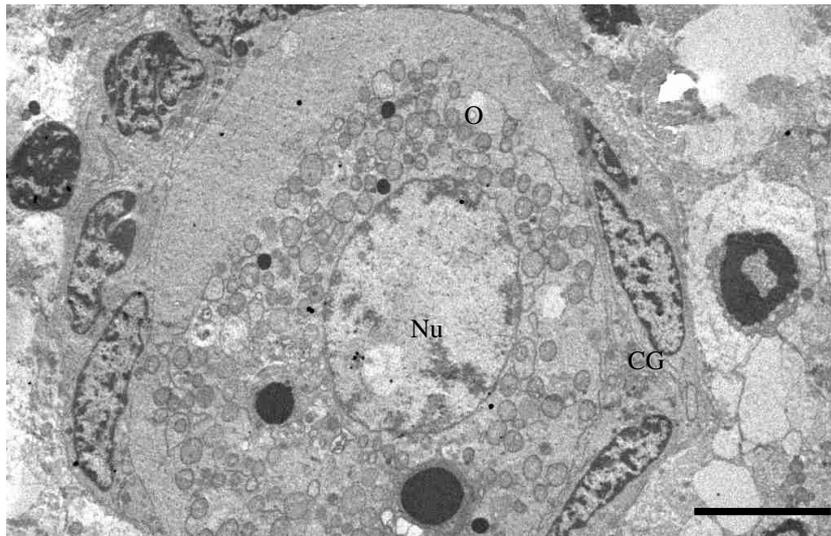


Figura 9. Folículo mantido a 20<sup>o</sup>C por 18 hs. O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo. Note as regiões despovoadas no citoplasma do ovócito. Barra = 5µm.

### **Controle cultivo**

Após 2hs de cultivo *in vitro* (Controle Cultivo), os folículos frescos apresentaram pequenos espaços entre o ovócito e a célula da granulosa (Figura 10), reduzindo o contato entre essas células a pontos específicos. Salvo tal característica, os outros aspectos foram similares aos folículos dos controles do Abatedouro e do Laboratório.

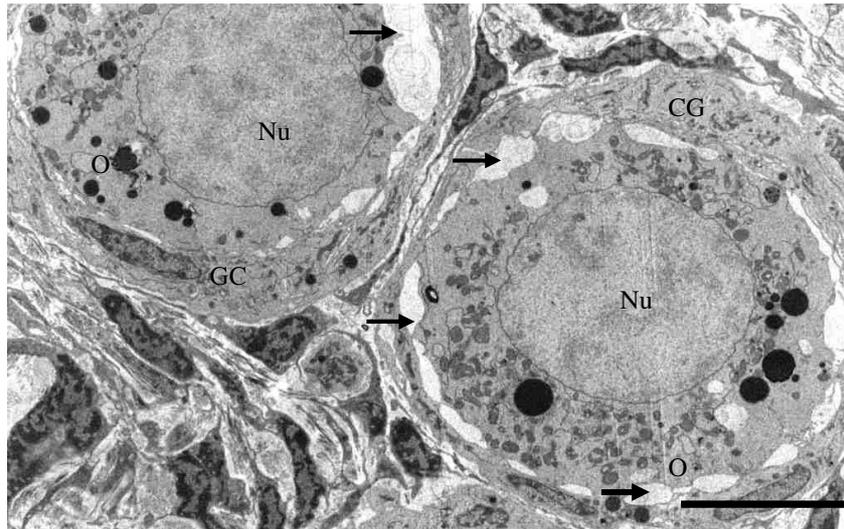


Figura 10. Folículos do grupo controle cultivado. O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo. Note os espaços entre o ovócito e as células da granulosa (seta). Barra = 10 µm.

### **Resfriamento com posterior cultivo**

Assim como no controle CIV, os folículos resfriados a 4°C ou a 20°C e posteriormente cultivados também apresentaram perda parcial de contato físico entre ovócito e células da granulosa (Figuras 11A e 12A).

Nos folículos resfriados a 4°C e posteriormente cultivados pode-se observar que a aparência de alguns ovócitos estava mais complexa e elaborada, em comparação a um ovócito imaturo quiescente, sugerindo uma maior atividade metabólica. Estes ovócitos apresentavam um maior número de organelas, especialmente mitocôndrias, as quais eram maiores e alongadas e com maior número de cristas (Figuras 11A e 11B). Já os folículos resfriados a 20°C apresentaram estrutura bastante semelhante ao controle, ou seja, mitocôndrias de formato redondo a ovalar com poucas cristas e eletrodensidade similar ao citosol do ovócito, condizente com ovócitos imaturos quiescentes (Figuras 12A e 12B). As alterações observadas nos folículos estocados a 20°C antes de passarem pelo CIV (Figura 9) não foram mais vistas após o CIV (Figura 12). Isto sugere que o CIV foi capaz de reverter alterações aparentemente causadas pelo período de estoque a 20°C.

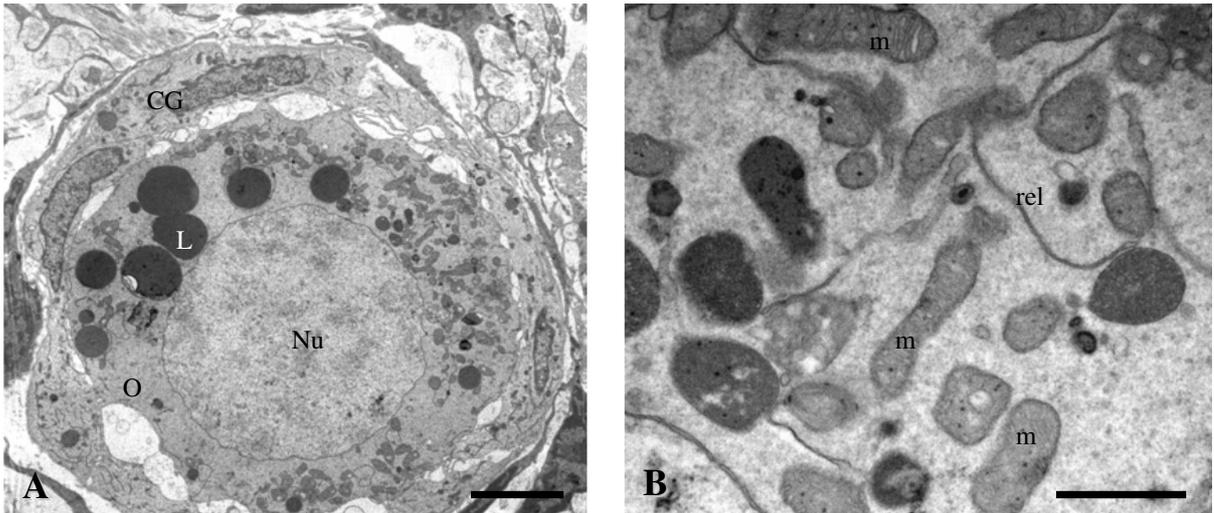


Figura 11. Visão geral de um folículo primordial em tecido ovariano mantido a 4°C por 18 hs e cultivado *in vitro*. (A) Observe os espaços entre o ovócito e as células da granulosa. Barra = 5  $\mu\text{m}$ . Detalhes das organelas são mostrados em (B) O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, L: gota de lipídio, m: mitocôndria, rel: retículo endoplasmático liso. Repare nas mitocôndrias alongadas. Barra = 1  $\mu\text{m}$ .

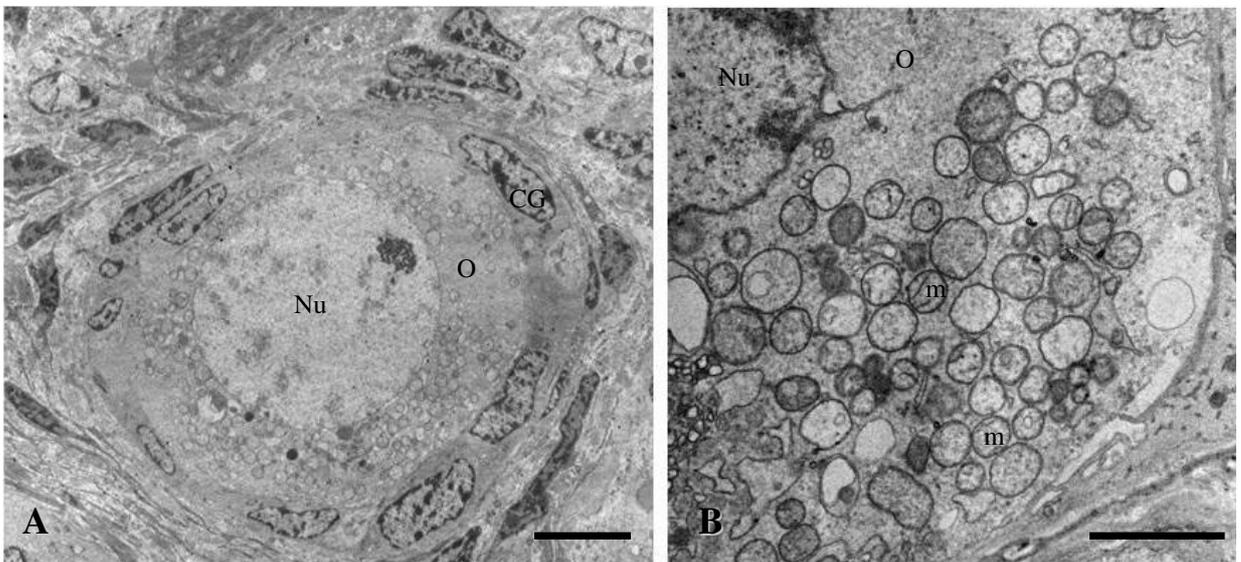


Figura 12. Visão geral de um folículo primordial em tecido ovariano mantido a 20°C por 18 h e cultivado *in vitro*. (A). Barra = 5  $\mu\text{m}$ . Detalhes das organelas são mostrados em (B). O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, m: mitocôndria. Barra = 2  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

O presente trabalho evidenciou ser possível a manutenção de ovários suínos em temperaturas de 4°C ou 20°C por até 18 hs sem perda da qualidade dos ovócitos inclusos em folículos ovarianos primordiais segundo análise histológica e ultra-estrutural realizadas.

Outros estudos têm sido conduzidos para avaliar os efeitos do estoque a baixas temperaturas na qualidade de folículos pré-antrais. Em geral, os pesquisadores optam em estocar a 4°C e 20°C para a preservação da morfologia normal de folículos ovarianos pré-antrais de ovelhas (Andrade et al., 2001; Matos et al., 2004), cabras (Silva et al., 2000; Carvalho et al., 2001; Ferreira et al., 2001) e vacas (Lucci et al., 2004). Em geral, esses trabalhos mostraram que o estoque a 20°C tem sido eficaz para a preservação de folículos pré-antrais em curtos períodos (4 ou 12hs) e a 4°C foi efetivo por longos períodos de preservação (18 ou 24hs) sob análise de microscopia de luz. Entretanto, algumas vezes, a posterior análise por microscopia eletrônica de transmissão mostrou diferentes resultados. Por exemplo, nos estudos de Silva et al. (2000) e Carvalho et al. (2001) a microscopia de luz mostrou que folículos pré-antrais foram morfologicamente normais após 24hs estocados a 4°C, contando com a microscopia eletrônica de transmissão revelaram que folículos pré-antrais foram normais apenas até 12hs sob a mesma temperatura.

Em suínos, Lucci et al. (2007) relataram que o estoque de ovários a 4°C e 20°C por até 18hs não afetou a morfologia de folículos primordiais, e o estoque a 4°C por até 18hs ou a 20°C por até 6hs não afetou a morfologia dos folículos em crescimento e sua habilidade em crescer *in vitro*. É bem conhecido que somente a análise de microscopia de luz não é suficiente para avaliar a viabilidade do ovócito e demais células adjacentes, sendo tal método incapaz de localizar um dano ovocitário ultra-estrutural, que poderá impossibilitar seu posterior desenvolvimento. Além disso, outros estudos demonstram que ovócitos suínos recolhidos de folículos antrais não sobrevivem ao resfriamento a 15°C ou abaixo disso (Didion et al., 1990). Entretanto, estudos *in vitro* tem mostrado que folículos em crescimento são mais sensíveis a eventos degenerativos do que folículos primordiais (Gosden, 2000; Shaw et al., 2000).

Sob microscopia de luz, dois tipos de degenerações são descritos para os folículos pré-antrais estocados no tecido ovariano. Degeneração tipo I é

caracterizada por um ovócito contraído com núcleo picnótico, mas com as células da granulosa normais. Degeneração tipo II é caracterizada pelo ovócito contraído, células da granulosa desorganizadas e baixa densidade celular (Silva et al.,2002; Lucci et al., 2004). Degeneração tipo I foi predominante após o estoque a 4°C e nas amostras controles, a degeneração tipo II foi mais freqüente nos folículos estocados a 20°C, sugerindo que é causada pelas condições de estoque. No presente trabalho, os aspectos mais observados de degenerações em todos os tratamentos foi o núcleo picnótico e a degeneração do ovócito (ovócito retraído e citoplasma vacuolizado) ambos achados nas características da degeneração tipo I. Folículos totalmente degenerados foram raros neste estudo. Isto pode ser em função de que os folículos primordiais são mais resistentes às condições adversas devido ao seu natural menor metabolismo e pobre diferenciação (Gosden, 2000; Shaw et al., 2000).

Em alguns trabalhos, a análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou diferentes resultados comparada com a microscopia de luz. Após a análise por MET dos folículos estocados a 4°C e 20°C por 18 hs, os mesmos mostraram algumas anormalidades ultra estruturais sugerindo processo degenerativo precoce. Entretanto, folículos do mesmo tratamento colocados em cultivo *in vitro* revelaram um tipo de regeneração de sua ultra-estrutura. Isso pode ter acontecido em função dos danos serem tênues e puderem ser revertidos pelo curto período de cultivo. De acordo com Paynter et al. (1999), o processo de reaquecimento do tecido resfriado em um ambiente rico em nutrientes permite às células foliculares restabelecer sua atividade metabólica. Sendo assim, a atividade metabólica celular pode reparar danos delicados que foram sofridos antes.

Após a microscopia eletrônica de transmissão, os folículos estocados a 4°C ou a 20°C mostraram algumas alterações em sua ultra-estrutura sugerindo processos degenerativos iniciais. As mudanças observadas foram principalmente mitocôndrias inchadas e redução no número de cisternas do retículo endoplasmático. O inchaço mitocondrial pode ser devido a mudanças no balanço iônico. Por outro lado, a baixa quantidade das cisternas de retículo endoplasmático liso pode refletir o baixo metabolismo celular. Como no presente trabalho a temperatura de estoque dos ovários foi reduzida para baixar o metabolismo celular, o decréscimo na quantidade de cisternas de retículo endoplasmático é natural e foi esperado. No entanto, quando os

folículos foram submetidos ao cultivo *in vitro* sua ultra-estrutura foi estaurada. Isto pode ter acontecido porque as mudanças foram tênues e puderam ser revertidas pelo curto período de cultivo *in vitro*.

Além disso, o tecido ovariano que foi mantido a 4<sup>o</sup>C e posteriormente cultivado *in vitro*, apresentaram alguns folículos com aparência mais complexa, com maior número de mitocôndrias, sendo elas maiores, mais alongadas e com mais cristas, sugerindo uma atividade metabólica maior. Em um trabalho Pribenszky et al., (2005), demonstraram que um prévio tratamento de pressão aumentou a sobrevivência de blastocistos congelados tão bem quanto a velocidade de desenvolvimento, e a taxa de eclosão. Baseado nesses achados, especulamos que a temperatura de 4<sup>o</sup>C foi como uma condição prévia de estresse aos folículos primordiais e seus ovócitos estimulados a desenvolver uma ultra-estrutura mais complexa após o cultivo *in vitro*.

Embora o cultivo *in vitro* foi capaz de melhorar a aparência geral dos folículos primordiais suínos estocados, algumas desconexões entre o ovócito e as células da granulosa puderam ser observadas. Esses achados são provavelmente devido às condições sub ótimas de cultivo *in vitro*. De acordo com alguns autores (Eppig, 1979; Eppig, 1991; Buccione et al., 1990), a manutenção da íntima associação e cooperação metabólica entre o ovócito e as células da granulosa são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do ovócito. Os resultados achados no presente trabalho mostram que o sistema de cultivo usado necessita ser aprimorado.

## **CONCLUSÕES**

O tecido ovariano suíno pode ser estocado a 4<sup>o</sup>C ou 20<sup>o</sup>C por até 18hs com alta porcentagem de folículos primordiais normais. Além disso, o estoque de tecido ovariano suíno a 4<sup>o</sup>C ou 20<sup>o</sup>C por 18hs associado à 2hs de cultivo *in vitro* pode melhorar a aparência ultra-estrutural dos ovócitos suínos inclusos em folículos primordiais.

## **AGRADECIMENTOS**

Esse trabalho recebeu financiamento de FAP-DF, CAPES, FINATEC e CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, E. R; Rodrigues, A. P; Amorim, C. A; Carvalho, F. C; Dode, M. A; Figueiredo, J. R; Short term maintenance of sheep preantral follicles *in situ* in 0.9% saline and Braun-Collins solution. **Small Rumin. Res.** 41, 141-149, 2001.

Andrade, E. R; Amorim, C. A; Matos, M. H. T; Rodrigues, A. P. R; Silva, J. R. V; Dode, M. A. N; Figueiredo, J. R; Evaluation of saline and coconut water solution in the preservation of sheep preantral follicles *in situ*. **Small Rumin. Res.** 43, 235-243, 2002.

Buccione, R; Schroeder, A. C; Eppig, J. J; Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol. Reprod.** 43, 543-547, 1990.

Carroll, J. and Gosden, R.G; Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. **Hum. Reprod.** 8, 1163-1167, 1993.

Carvalho, F. C. A; Lucci, C. M; Silva, J. R. V; Andrade, E. R; Bão, S. N; Figueiredo, J. R; Effect of Braun-Collins and Saline solution at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved *in situ*. **Anim. Reprod. Sci.** 66, 195-208, 2001.

Didion, B.A; Pomp, D; Martin, M.J; Homanics, G.E; Markert, C.L; Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **J. Anim. Sci.**, 68, 2803-2810, 1990.

Eppig, J. A; Comparison between oocyte grow in co-culture with granulose cells and oocytes with granulose cell-oocyte junctional contact maintained *in vitro*. **J. Exp. Zool.** 209, 345-353; 1979.

Eppig, J. J; Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bio Essays**, 13, 569-574, 1991.

Erickson, G. F; An analysis of follicle development and ovum maturation. **Semin. Reprod. Endocrinol.** 4, 233-254, 1986.

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 ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, 55, 1607-1617, 2001.

Gosden, R. G; Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Mol. Cell. Endocrinol.** 163, 125-129, 2000.

Lucci, C. M; Silva, R. V; Carvalho, C. A; Figueirdo, R; Bão, S. N; Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rum. Res.**, 41, 61-69, 2001.

Lucci, C. M; Kacinskis, M. A; Rumpf, R; Bao, S. N; Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos Indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, 61, 461-472, 2004.

Lucci, C. M; Schreier, L. L; Machado, G. M; Amorim, C. A; Bao, S. N; Dobrinsky, J. R; Effects of storing pig oocytes at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. **Reprod. Dom. Anim.** 42, 76-82, 2007.

Matos, M. H. T; Andrade, E. R; Lucci, C. M; Bao, S. N; Silva, J. R. V; Santos, R. R; Ferreira, M. A. L; Costa, S. H. F; Celestino, J. J. H; Figueiredo, J. R; Morphology and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, 62, 65-80, 2004.

Mc Evoy, T. G; Coull, G. D; Broadbent, P. J; Hutchinson, J. S. M; Speake, B. K; Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **J. Reprod. Fertil.** 118, 163-170, 2000.

Nagashima, H; Kashiwazaki, N; Ashman, R. J; Grupen, C. G; Seamark, R. F; Nottle, M. B; Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. **Biol. Reprod.** 51, 618-622, 1994.

Paynter, S. J; Cooper, A; Fuller, B. J; Shaw, R. W; Cryopreservation of bovine ovarian tissue: Structural normality of follicles after thawing and culture *in vitro*. **Cryobiology**, 38, 301-309, 1999.

Pribenszky, C; Molnar, M; Cseh, S; Solti, L; Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Anim Reprod. Sci.**, 87, 143-150, 2005.

Sathananthan, A. H; Kirb, C; Peura, A; Trounson, A; Mouse oocyte cooling. **J. Assist. Reprod. Genet.**, 9, 139-148, 1992.

Shaw, J. M; Oranratnachai, A; Trounson, A. O; Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, 53, 59-72, 2000.

Silva, J. R. V; Lucci, C. M; Carvalho, F. C. A; Bao, S. N; Costa, S. H. F; Santos, R. R; Figueiredo, J. R; Effect of Coconut Water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubations times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. **Theriogenology**, 54, 809-822, 2000.

Silva, J. R. V; Bao, 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*. **Anim. Reprod. Sci.**, 66, 209-223, 2001.

Silva, J. R. V; Ferreira, M. A. L; Costa, S. H. F; Santos, R. R; Carvalho, F. C. A; Rodrigues, A. P. R; Lucci, C. M; Bao, S. N; Figueiredo, J. R; Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Rum. Res.**, 43, 203-209, 2002.