

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E
ULTRAESTRUTURAL E DESCRIÇÃO DO PERFIL
LIPÍDICO DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE SUÍNOS.**

RENATA CARVALHO SILVA

Dissertação de Mestrado

Brasília - DF

2010



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E ULTRAESTRUTURAL E DESCRIÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE SUÍNOS.

Orientadora: Profa. Dr. Carolina Madeira Lucci

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do
título de Mestre em Biologia Animal.**

**Brasília – DF
2010**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a mim pela determinação em concretizá-lo e a minha orientadora, a Professora Doutora Carolina Madeira Lucci, por nunca ter deixado de acreditar no meu potencial como pesquisadora.

“As ciências têm as raízes amargas,
porém os frutos são muito doces”.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora e amiga Chefia, Doutora Carolina Madeira Lucci pelos seus ensinamentos, pela sua paciência, competência, profissionalismo e acima de tudo por sua doce forma de liderança. “A diferença entre um chefe e um líder: um chefe diz, Vá! - um líder diz, Vamos!” (E. M. Kelly)

À Professora Doutora Sônia Nair Bào por disponibilizar o Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão e por ser responsável por grande parte do meu aprendizado na vida profissional. “Sob a direção de um forte general, não haverá jamais soldados fracos”. (Sócrates)

Ao professor Ricardo Bentes de Azevedo por disponibilizar o Laboratório de Morfologia e Morfogênese, pelos ensinamentos repassados, pela graça e pelo respeito que tem por mim. “Uma máquina pode fazer o trabalho de cinquenta pessoas comuns. Nenhuma máquina pode fazer o trabalho de uma pessoa extraordinária” (Elbert Hubbard)

Ao professor Umberto Euzébio por disponibilizar o Laboratório de Morfologia e Morfogênese permitindo que parte do nosso trabalho pudesse ser realizada. “Um homem é um sucesso se pula da cama de manhã, vai dormir à noite e, nesse meio tempo, faz o que gosta” (Bob Dylan)

Ao professor Rui Curi por disponibilizar o laboratório do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela cordialidade e apoio para que a última etapa desse projeto pudesse ser finalizada. “A liderança é uma poderosa combinação de estratégia e caráter. Mas se tiver de passar sem um, que seja estratégia.” (Gen. Norman Schwarzkopf)

Ao mestrando Haroldo do Laboratório do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo tempo gasto me ensinando a técnica de extração lipídica pelo método

HPLC. "A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas".

À CAPES pela bolsa durante todo o período do mestrado e à FINATEC, FAP-DF, CNPq e FINEP pelo financiamento do projeto. "O dinheiro não tem a mínima importância desde que a gente tenha muito". (Truman Capote)

À minha nova amiga Luciana Dalcin por compartilhar muitos momentos, tanto os bons quanto os estressantes durante a realização desse projeto, pela ajuda na concretização do mesmo e pela amizade. "Na verdade, você nunca entende uma nova teoria. Você simplesmente a utiliza." (Albert Einstein)

À minha amiga Renata de Araujo Nobre Farias pela amizade que transcende qualquer obstáculo, por me ensinar a trabalhar no Excel e facilitar as minhas análises. "Com tua amizade consigo calar e te escutar. Deu-me um novo olhar sobre as pessoas que devo amar". (Arlisson Peres Marinho)

À minha amiga Emily Borges pelo simples fato de existir. "Para que levar a vida tão a sério, se a vida é uma alucinante aventura da qual jamais sairemos vivos?" (Bob Marley)

À minha família pelo amor incondicional mesmo nas horas em que eu estava insuportavelmente chata. "Preocupação é um juro pago antecipadamente" (W. R. Inge)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Ovocênese e Foliculogênese	3
2.2 População e caracterização morfológica de folículos ovarianos	7
2.3 Caracterização Ultraestrutural	12
2.3.1 Folículo Primordial	12
2.3.2 Folículo Primário.....	15
2.3.4 Folículo Secundário	17
2.3.5 Folículo Terciário	21
2.4 O lipídeo na reprodução	23
2.4.1 Conceito, estrutura e função dos lipídeos.....	23
2.4.2 Os ácidos graxos	24
2.4.3. Os lipídeos e os ovócitos	25
3. Justificativa	28
4. Objetivos.....	30
4.1 Objetivo Geral.....	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5. Materiais e métodos	31
5.1 Coleta e preparação dos ovários	31
5.2 Processamento para microscopia de luz.....	31
5.3 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão.....	32
5.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos ácidos graxos	33
5.5 Análise Estatística	34
6. Resultados.....	35
6.1 Histologia.....	35
6.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	36
6.2.1 Folículo Primordial	36
6.2.2 Folículo Primário.....	38
6.2.3 Folículo Secundário.....	39
6.2.4. Folículo Terciário	41

6.2.5. Método ósmio-imidazol.....	43
6.3 Perfil lipídico	44
7 Discussão	47
8. Conclusão.....	53
9. Referências Bibliográficas	54

LISTA DE ABREVIATÓES

AA = ácido araquidônico

ACN = acetonitrila

AL = ácido linoléico

ATP = adenosina trifosfato

CaCl₂ = cloreto de cálcio

CGP = células germinativas primordiais

CGs = células da granulosa

DHA = ácido docosahexanóico

EPA = ácido eicosapentanóico

FOPA = folículos ovarianos pré-antrais

HCl = ácido clorídrico

HCCl₃ = clorofórmio

H₂O = água

HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência

LH = hormônio luteinizante

M = molar

mL = mililitros

mm = milímetros

mM = milimolar

MET = microscopia eletrônica de transmissão

metOH = metanol

MOIFOPA = manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais

NaOH = hidróxido de sódio

PBS = tampão fosfato salina

PIVE = produção *in vitro* de embriões

RNA = ácido ribonucléico

ZP = zona pelúcida

µm = micrômetros

RESUMO

O conhecimento da morfologia de folículos ovarianos e ovócitos é crucial para o desenvolvimento e aplicação de tecnologias como cultivo *in vitro* e a criopreservação. O objetivo da dissertação foi descrever a morfometria de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), as características ultraestruturais e o perfil lipídico de folículos pré-antrais e antrais de suínos. Fragmentos de tecido ovariano foram processados para microscopias de luz e eletrônica de transmissão para análise dos FOPA. Folículos antrais foram dissecados e divididos em 3 categorias: <2mm; 2-4mm e 4-6mm e processados somente para microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras destinadas à MET foram processadas para rotina e para detecção de lipídeos (método ósmio-imidazol). Para extração de ácidos graxos os FOPA foram isolados e os ovócitos puncionados dos folículos antrais. Ambos foram processados seguindo a técnica de Folch *et al.* (1957). Folículos primordiais, primários e secundários mediram 34 ± 5 , 40 ± 7 e 102 ± 58 μm , respectivamente. Nos FOPA as organelas concentravam-se próximas ao núcleo do ovócito sendo as mitocôndrias arredondadas as mais abundantes, seguidas de retículo endoplasmático. Nos folículos primordiais e primários gotículas de lipídeo formavam um aglomerado na região cortical do ovócito. Nos folículos secundários a zona pelúcida circundava o ovócito e microvilosidades e projeções das células da granulosa estavam presentes. As mitocôndrias organizavam-se na forma de colar de pérolas e vesículas eram abundantes no citoplasma ovocitário. Nos terciários foi observado início da formação do espaço perivitelineo associado à liberação de microvilosidades da zona pelúcida, mais evidente em folículos maiores que 2mm. Os ovócitos eram repletos de vacúolos geralmente associados a outras organelas. O método ósmio-imidazol confirmou que as vesículas e vacúolos presentes nos ovócitos de folículos secundários e terciários eram gotas lipídicas ou vacúolos contendo lipídeo. Após extração lipídica, tanto nos FOPA quanto nos ovócitos de folículos antrais os ácidos graxos saturados foram encontrados em maior porcentagem, 71,91% e 94,63%, respectivamente. Porém, a proporção de ácidos graxos insaturados em folículos pré-antrais foi maior do que nos ovócitos de folículos antrais ($P < 0,05$). Em conclusão o presente trabalho descreveu a morfometria de FOPA assim como a ultraestrutura e o perfil de ácidos graxos de folículos pré-antrais e antrais. Além disso, demonstrou que ovócitos suínos são ricos em lipídeo e que seu conteúdo e natureza modificam à medida em que os folículos se desenvolvem.

Palavras-chave: ácidos graxos, microscopia eletrônica, ovócito, porca.

ABSTRACT

The knowledge of ovarian follicle and oocyte morphology is crucial to the development of reproductive biotechnologies associated to the female gamete, such as cryopreservation and *in vitro* embryo production. The aim of the present work was to characterize pig preantral follicles (PAF) morphometry and the ultrastructure and lipid composition of preantral and antral follicles. Ovarian tissue was processed for light and transmission electron microscopy (TEM) for PAF analysis. Antral follicles were dissected and divided into 3 groups: < 2mm; 2-4mm and 4-6mm, and processed for TEM. At TEM, ovarian follicles were processed for routine and osmium-imidazole method (lipid detection). For lipid extraction, PAF were isolated and oocytes were aspirated from antral follicles. They were processed according to Folch *et al.* (1957). Primordial, primary and secondary follicles had 34 ± 5 , 40 ± 7 and 102 ± 58 μm in diameter, respectively. In PAF the most abundant organelles were round mitochondria, and endoplasmic reticulum. At primordial and primary follicle oocytes, lipid droplets had polarized localization. In secondary follicles round mitochondria were organized as strings of pearls and many electron-lucent vesicles were observed. The zona pellucida completely surrounded the oocyte and some microvilli and granulosa cells projections were seen through it. In antral follicles the development of perivitelline space was associated with the liberation of microvilli from the zona pellucida, more evident when follicles were bigger than 2mm. Antral follicles oocytes presented many electron-lucent vacuoles all over the cytoplasm and these structures were often associated with other organelles. The osmium-imidazole method confirmed that most of these vesicles and vacuoles seen in secondary and antral follicle oocytes were lipid droplets or vacuoles contenting lipid. After lipid extraction, saturated fatty acids were the most abundant in PAF (71.91%) and in oocytes from antral follicles (94.63%). However, the proportion of unsaturated fatty acids was bigger in PAF, than in antral follicle oocytes ($P < 0.05$). In conclusion, this work described the morphometry of PAF as well as, the ultrastructure and lipid composition of preantral and antral follicles oocytes in pigs. In addition, it proved that pig oocytes are rich in lipids and the nature of lipid contents changes as the follicle develops.

Keywords: electron microscopy, fatty acids, oocyte, porcine.

1. Introdução

Existem milhares de folículos ovarianos nos ovários de mamíferos, porém, aproximadamente 99,9% são eliminados pelo processo de atresia folicular (Guilbault *et al.*, 1986). Dessa forma, do ponto de vista comercial, o potencial reprodutivo da fêmea é pouco aproveitado, uma vez que apenas 0,1% dos ovócitos chegam à ovulação. Para contornar esta situação, a utilização e o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução animal tornam-se condições indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas. Tecnologias como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), criopreservação de ovócitos e a manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) têm sido foco de interesse recentemente.

Um passo importante para que essas biotecnologias possam avançar, é o estudo da morfologia e da fisiologia de ovócitos e folículos ovarianos. Este conhecimento permite estabelecer um padrão de normalidade, e desta forma torna possível identificar danos que as células germinativas estejam sofrendo durante as manipulações.

Outro aspecto que vem sendo estudado recentemente é o conteúdo lipídico de células germinativas femininas, uma vez que a quantidade e o tipo de lipídeo podem interferir na sua qualidade após aplicação de biotecnologias como a criopreservação, por exemplo. De fato, muitos trabalhos sobre caracterização do perfil lipídico de ovócitos vêm sendo conduzidos em diversas espécies.

Especialmente em suínos, os ovócitos possuem grande quantidade de lipídeo no citoplasma. Esta característica tem sido relatada como causa dos resultados limitados que a criopreservação de ovócitos apresenta nesta espécie. No entanto, estes estudos foram feitos em ovócitos de folículos antrais, e especula-se que exista uma diferença tanto no conteúdo lipídico como na relação de ácidos graxos entre folículos antrais e pré-antrais. A morfometria e a ultraestrutura de ovócitos e folículos ovarianos de porcas, bem como a descrição do perfil lipídico na fase pré-antral, ainda não foram totalmente descritos. Desta forma, estudos a este respeito tornam-se necessários e podem ser de grande valia para o avanço de biotecnologias da reprodução nesta espécie.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Ovogênese e Foliculogênese

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional dos ovários de mamíferos, e garante o micro-ambiente necessário para o crescimento e a maturação do ovócito (Saumande, 1991). Ele desempenha duas funções que são interdependentes: a produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos e a gametogênese. Nesta última o folículo é um elemento essencial para a manutenção da viabilidade ovocitária, para assegurar o crescimento e a maturação dos ovócitos e, finalmente, para liberar, na maioria das espécies, um complexo cumulus-ovócito maduro no processo da ovulação (Ross *et al.*, 1995).

O ovário adulto contém folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 1) que se localizam na sua parte mais externa, o córtex (Koering *et al.*, 1969; Guraya, 1985; van Wezel & Rodgers, 1996). A formação, o crescimento e o desenvolvimento dos folículos e seus ovócitos são devido a dois processos que ocorrem concomitantemente no ovário: a foliculogênese e a ovogênese, respectivamente.

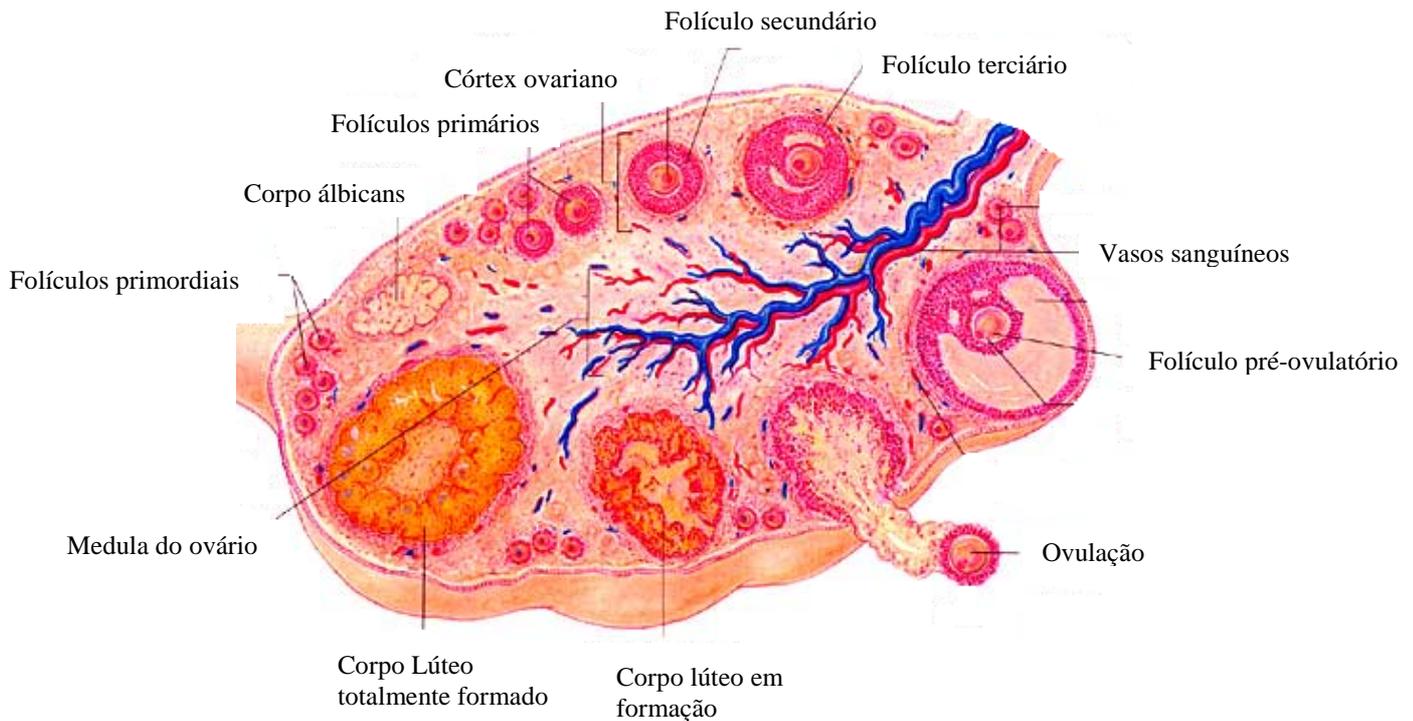


Figura 1. Figura esquemática mostrando os diferentes estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos distribuídos no córtex do ovário. **Fonte: disponível em: www.uqtr.ca/Actualite/Entete (Adaptado).**

A ovogênese é definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do ovócito haplóide (Rüsse, 1983). As CGP têm origem extragonadal e são formadas durante o período embrionário a partir do saco vitelínico e se caracterizam por serem móveis e altamente invasivas (Hirshfield, 1991). Ainda na vida fetal, nos mamíferos, as CGP migram para o mesênquima da crista genital e colonizam a gônada indiferenciada (Wassarman, 1994). Nesse local, as CGP perdem a sua característica móvel, tornam-se mais esféricas (Donovan *et al.*, 1986) e multiplicam-se por mitose, podendo atingir no bovino, em torno de dois milhões de células por animal (Erickson, 1966).

Após um processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP, dentro do ovário, multiplicam-se ativamente e diferenciam-se em ovogônias. As ovogônias crescem, duplicam seus cromossomos dando origem aos ovócitos primários, que entrarão em primeira divisão meiótica. O núcleo ovocitário passará,

sucessivamente, por quase todos os estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno). Porém, o processo meiótico é interrompido (primeira interrupção da meiose) no estágio de diplóteno ou de vesícula germinativa. O núcleo do ovócito permanecerá neste estágio pelo menos até que o animal atinja a puberdade (Ross *et al.*, 1995).

Durante o período em que o núcleo ovocitário se encontrar na fase de prófase I, o ovócito empreenderá uma intensa fase de crescimento, caracterizada por um aumento na atividade transcripcional (síntese de RNA), acúmulo de lipídeos na região cortical do ovócito e absorção ativa e/ou passiva de diferentes nutrientes.

Quando o animal atinge a puberdade, devido à ocorrência dos picos pré-ovulatórios de LH, algumas horas antes da ovulação, a meiose é retomada e o núcleo ovocitário entra em diacinese. Nesse momento, inicia-se o processo de rompimento da vesícula germinativa que é seguida das fases de metáfase I, anáfase I, telófase I, quando então ocorrerá a expulsão do primeiro corpúsculo polar, resultando na formação do ovócito secundário, assim denominado pelo fato de seu núcleo encontrar-se na segunda divisão meiótica. A segunda divisão meiótica é caracterizada por uma rápida passagem pela fase de prófase II, que progredirá até metáfase II, quando então ocorre a segunda interrupção da meiose. O ovócito retomará a meiose somente quando for fecundado pelo espermatozóide. Nesse caso, o núcleo do ovócito passará, sucessivamente, pelos estágios de anáfase II e telófase II, seguido da expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do ovócito haplóide, marcando assim, o fim da ovogênese (Figura 2; Junqueira & Carneiro, 1999).

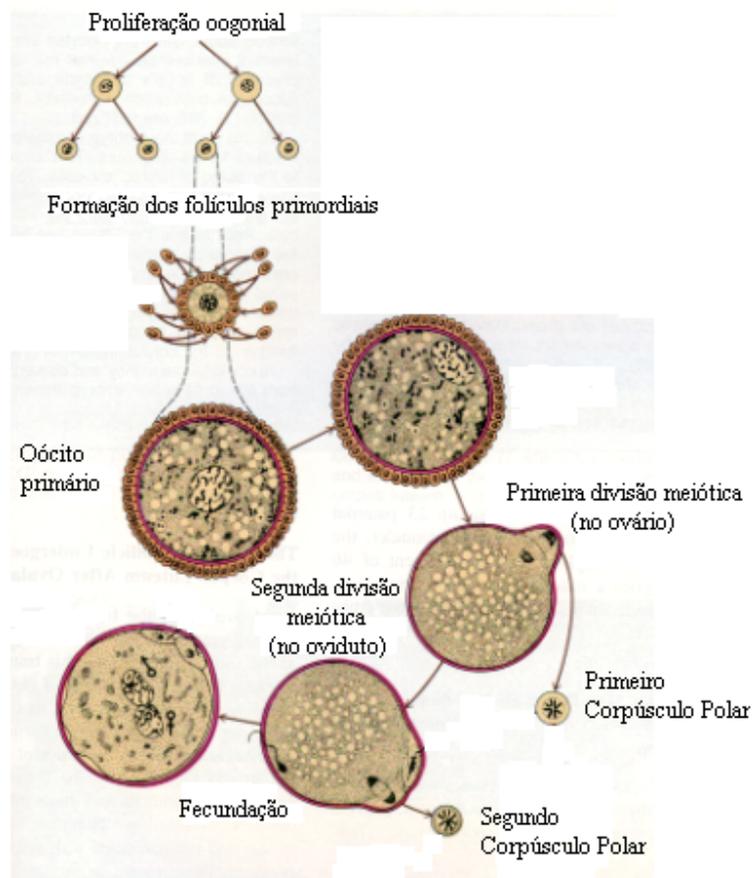


Figura 2 Desenho esquemático mostrando as principais etapas da ovogênese. **Fonte:** Adaptado de Ross *et al.* (1995).

Já a foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (Saumande, 1981). Uma vez que a função do folículo é proporcionar um ambiente ideal para a manutenção da viabilidade, crescimento e maturação ovocitária, a foliculogênese ocorre simultaneamente à ovogênese quando o ovócito estiver entre as fases de prófase I à metáfase II, na maioria das espécies (Ross *et al.*, 1995).

Nas vacas, nas ovelhas e nas porcas, no segundo terço de gestação, uma camada de células somáticas planas ou achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, originárias do mesoderma, circundam o ovócito primário ou imaturo (núcleo em prófase I), formando o primeiro e mais primitivo

dos estágios foliculares, que é denominado folículo primordial (Ross *et al.*, 1995).

Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de multiplicar-se e o folículo entra no período de dormência ou quiescência. Estes folículos quiescentes representam o *pool* de reserva de células germinativas femininas, e podem permanecer neste estado por meses ou anos (Hirshfield, 1991). Todos os dias uma quantidade de folículos primordiais se torna ativa, as células da granulosa começam a se dividir e os ovócitos começam a crescer (Rodgers & Irving-Rodgers, 2009). Após ativação, os folículos passam sucessivamente pelos estágios de folículos primários e secundários (pré-antrais) e terciários (antrais) até chegar ao estágio de folículo pré-ovulatório (Ross *et al.*, 1995). As características dos folículos de cada classe serão abordadas em detalhe adiante. Elas permitem fazer comparações entre as várias espécies e ajudam a explicar diferenças fisiológicas peculiares de cada uma.

2.2 População e caracterização morfométrica de folículos ovarianos

A população folicular total no ovário foi estimada em aproximadamente 235.000 folículos na vaca (Betteridge *et al.*, 1989), 160.000 na ovelha (Driancourt, 1991), 37.000 na cabra (Lucci *et al.*, 1999), 10.000 no camundongo (Gosden & Telfer, 1987), 48.500 na gata (Carrizo-Junior *et al.*, 2009), 38.000 na cadela (Marinho *et al.* 2007), 2.000.000 na mulher (Erickson, 1966) e 210.000 na porca (Gosden & Telfer, 1987). Os folículos pré-antrais representam 90% dessa população folicular (Saumande, 1991) e são os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário (Guilbault *et al.*, 1986).

Os folículos ovarianos são classificados em não cavitários ou pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) e cavitários ou antrais (folículos terciários e folículos pré-ovulatórios) que são diferenciados entre si pela presença de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro. Já os folículos pré-antrais são classificados de acordo com a forma e o número de camadas de células da granulosa que circundam o ovócito (Ross *et al.*, 1995). Os folículos primordiais possuem um pequeno ovócito quiescente, sem zona

pelúcida, circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso (Figura 3). Esses folículos se apresentam desta forma, pois o ovócito não está crescendo e as células da granulosa não estão se replicando (Fair *et al.* 1997). Os diâmetros de folículo, ovócito, assim como o número de células da granulosa que circundam o ovócito de folículos primordiais variam de acordo com a espécie (Quadro 1).

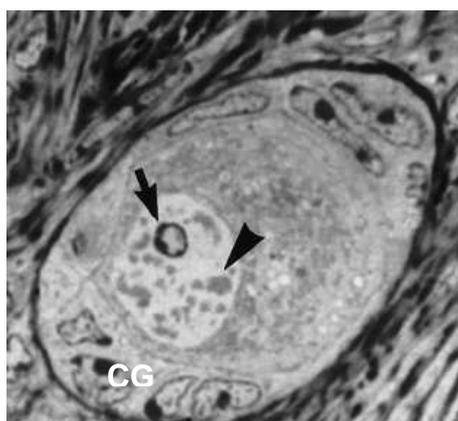


Figura 3. Microscopia de luz de folículo primordial bovino com uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso ao redor do ovócito. CG = célula da granulosa. Ponta de seta mostra cromatina condensada do núcleo e seta o nucléolo. X1.200 **Fonte: Fair *et al.* (1997)**

Quadro 1. Diâmetros (μm) de folículo e ovócito e número de células da granulosa de folículos primordiais em diferentes espécies.

Espécie	Diâmetro do folículo	Diâmetro do ovócito	Nº de células da granulosa	Referência
Bovino	36,0	28,1	7,3	Kacinskis <i>et al.</i> (2005)
Bubalino	35,0	24,9	-	Mondadori <i>et al.</i> (2007)
Ovino selvagem	40,8	34,6	16,0	Lundy <i>et al.</i> (1999)
Caprino	20,0	15,9	5,7	Lucci <i>et al.</i> (2001)
Felino	28,3	23,1	6,5	Carrijo-Junior <i>et al.</i> (2009)
Canino	27,5	21,7	6,0	de Campos <i>et al.</i> , (2007)
Humano	40,4	35,5	7,9	Westergaard <i>et al.</i> (2007)

Quando estes folículos são ativados, seus ovócitos iniciam crescimento, com aumento de volume, e as células da granulosa passam a ter um formato cubóide (Fair *et al.* 1997). Sabe-se que as células da granulosa além de se tornarem mais volumosas, também se multiplicam por mitose nesse estágio de desenvolvimento (Giomett, 2003). Alguns autores consideram como primordiais folículos que possuam algumas células da granulosa cubóides, geralmente localizadas em um dos pólos do folículo, juntamente com células da granulosa pavimentosas (van Wezel & Rodgers, 1996). Para Gougeon & Chainy (1987) esses folículos são tão numerosos quanto os folículos primordiais, possuem o mesmo tamanho, porém com maior número de células da granulosa quando observado nos cortes histológicos. Os termos “em transição” ou “intermediários” também são utilizados para classificar estes folículos (Westergaard *et al.* 2007; Rice *et al.* 2008). Dessa forma, folículos primários são aqueles cujos ovócitos são totalmente circundados por uma camada de células da granulosa de formato cubóide (Figura 4). Existe uma grande variação no diâmetro dos folículos primários assim como no número de células da granulosa que circundam o ovócito das diversas espécies já estudadas, como pode ser observado no Quadro 2.

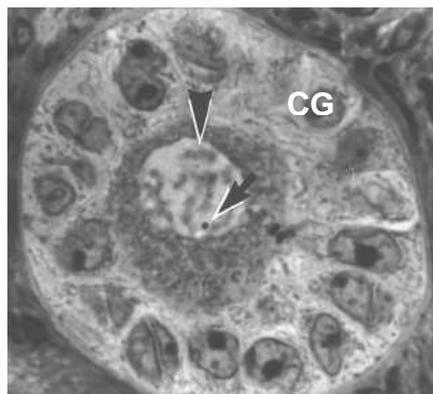


Figura 4. Microscopia de luz de folículo primário bovino com uma camada de células da granulosa de formato cubóide ao redor do ovócito. CG = célula da granulosa. Cabeça de seta mostra cromatina condensada do núcleo e seta o nucléolo. X1.040 **Fonte: Fair *et al.* (1997)**

Quadro 2. Diâmetros (μm) de folículo e ovócito e número de células da granulosa de folículos primários em diferentes espécies.

Espécie	Diâmetro do folículo	Diâmetro do ovócito	Nº de células da granulosa	Referência
Bovino	48,5	31,7	14,6	Kacinskis <i>et al.</i> (2005)
Bubalino	41,8	26,9	-	Mondadori <i>et al.</i> (2007)
Ovino	75,2	52,1	128,0	Lundy <i>et al.</i> (1999)
Caprino	24,4	17,3	11,4	Lucci <i>et al.</i> (2001)
Felino	41,0	30,1	13,2	Carrijo-Junior <i>et al.</i> (2009)
Canino	42,6	27,8	15,0	de Campos <i>et al.</i> , (2007)
Canino	40,2	-	-	Doleiel <i>et al.</i> (2004)
Humano	54,4	39,7	26,6	Westergaard <i>et al.</i> (2007)

Na maioria das espécies, os folículos secundários apresentam ovócito circundado por uma zona pelúcida que é constituída de glicoproteínas produzidas pelas células foliculares e por várias camadas de células da granulosa cubóides (Figura 5). Células especializadas do estroma iniciam sua diferenciação em teca interna, constituída de tecido conjuntivo frouxo e rica em vasos sanguíneos e em teca externa, fibrosa e resistente (Rodgers & Irving-Rodgers, 2009). Alguns autores relatam que elas estão presentes em folículos primordiais e primários (Hirshfield, 1991) sugerindo que essas células participem do crescimento folicular nos diferentes estágios de desenvolvimento.

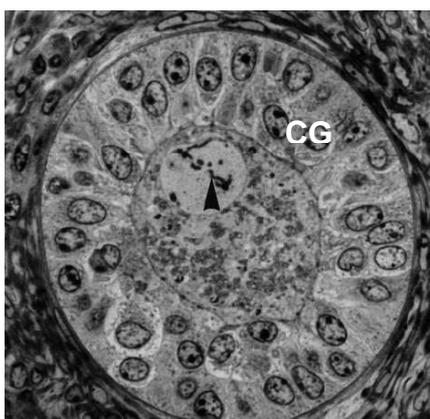


Figura 5. Microscopia de luz de folículo secundário bovino com várias camadas de células da granulosa de formato cubóide ao redor do ovócito. CG = célula da granulosa. Ponta de seta mostra cromatina condensada do núcleo. X750
Fonte: Fair *et al.* (1997)

Concomitantemente à intensa proliferação das células da granulosa, uma cavidade repleta de líquido, o antro, é formada (Figura 6). As células da granulosa ao redor do ovócito se diferenciam em células do cumulus e juntamente com as células da granulosa murais continuam a se multiplicar; o antro também continua a se expandir (Reader, 2007). Esses folículos são chamados de antrais, que crescerão, mas apenas alguns deles serão ovulados (Ireland, 1987).

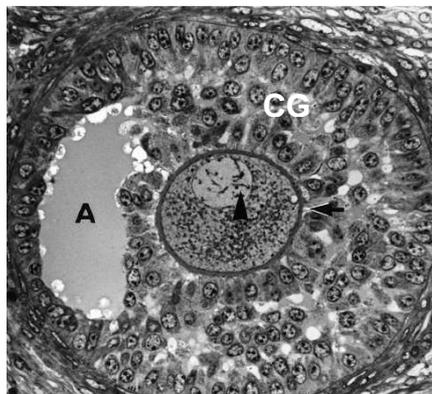


Figura 6. Microscopia de luz de folículo antral bovino com várias camadas de células da granulosa de formato cubóide ao redor do ovócito e a presença do antro (A). CG = células da granulosa. Cabeça de seta mostra cromatina condensada do núcleo e a seta aponta a zona pelúcida. X370 **Fonte: Fair et al. (1997).**

Nos folículos secundários, a variação mais observada está no quesito número de células da granulosa ao redor do ovócito (Quadro 3), uma vez que o início de formação de antro ocorre em diferentes diâmetros foliculares, nas diversas espécies. No suíno, por exemplo, o antro começa a ser formado quando o folículo ovariano atinge 400 μm de diâmetro (Morbeck *et al.*, 1992) e já no bovino quando atinge 200 μm (Figueiredo *et al.*, 1994).

Quadro 3. Diâmetros (μm) de folículo e ovócito e número de células da granulosa de folículos secundários em diferentes espécies.

Espécie	Diâmetro do folículo	Diâmetro do ovócito	Nº de células da granulosa	Referência
Bovino	88,4	43,8	62,0	Kacinskis <i>et al.</i> (2005)
Bubalino	53,3	26,9	-	Mondadori <i>et al.</i> (2007)
Ovino	128,5	72,9	637	Lundy <i>et al.</i> (1999)
Caprino	44,2	24,5	31,0	Lucci <i>et al.</i> (2001)
Felino	74,6	40,8	46,2	Carrijo-Junior <i>et al.</i> (2009)
Canino	101,6	48,0	61,5	de Campos <i>et al.</i> , (2007)
Canino	102,4	-	-	Doleiel <i>et al.</i> (2004)

Os folículos ovarianos de todas as classes são envoltos por uma lâmina basal (Fair *et al.*, 1997). Como pode ser observado nos quadros apresentados, o diâmetro dos folículos e dos seus respectivos ovócitos aumenta durante o desenvolvimento de primordiais a secundários. Esse aumento ocorre devido à proliferação e aumento no volume das células da granulosa e no caso dos ovócitos pelo acúmulo de componentes citoplasmáticos e expansão do ovoplasma (Fair *et al.*, 1997).

2.3. Caracterização Ultraestrutural

2.3.1. Folículo Primordial

Os folículos primordiais possuem ovócito oval ou esférico, com núcleo central ou excêntrico. O nucléolo de ovócitos inclusos em folículos primordiais é transcricionalmente inativo, caracterizado por um retículo no qual grânulos são embebidos e quantidade variada de vacúolos está presente (Fair *et al.*, 1997a). O tamanho dos vacúolos determina o formato do nucléolo; em anel ou em forma de retículo compacto. Por outro lado, para Reader (2007) características como nucléolo reticulado e membrana nuclear porosa indicam transcrição ativa de genes e síntese de RNA ribossomal. O citoplasma do ovócito é caracterizado pela presença de organelas localizadas próximas ao

núcleo, sendo as mitocôndrias redondas as mais abundantes (Figura 7). As redondas com cristas periféricas e grânulos elétron-densos em sua matriz são descritas em bovinos (Fair *et al.*, 1997a). Ainda em bovinos e também em bubalinos, as mitocôndrias possuem cristas transversais dividindo sua matriz em dois ou três compartimentos (Kacinskis *et al.*, 2005; Mondadori *et al.*, 2007). Já nas mitocôndrias de ovócitos caprinos, cristas transversais paralelas à superfície da membrana externa da matriz mitocondrial deixam em evidência uma área central e larga de elétron-densidade moderada (Lucci *et al.*, 2001). Por fim, Carrijo-Junior *et al.* (2009) descrevem dois tipos de mitocôndrias em ovócitos de gatas: as de baixa elétron-densidade com poucas cristas periféricas e as muito elétron-densas repletas de cristas. A presença destas mitocôndrias redondas, conhecidas como imaturas, é condizente com o estágio de folículos primordiais que possuem ovócito quiescente e que não requer grande quantidade de energia para sobreviver (Kacinskis *et al.*, 2005).

Além de mitocôndrias, o ovoplasma de folículo primordial contém gotas lipídicas, retículo endoplasmático, algumas cisternas de complexo de Golgi, polirribosomos e poucas vesículas. Muitas vezes o retículo endoplasmático, as mitocôndrias e as gotas lipídicas encontram-se em associação (Figura 8). Esta associação permite a eficiente transmissão de sinais de cálcio citosólicos para a mitocôndria possibilitando a ativação do metabolismo mitocondrial e aumento do suprimento de ATP para as bombas de cálcio no retículo endoplasmático (Rizzuto *et al.*, 2000; Dumollard *et al.*, 2007). Nas cabras, búfalas e ovelhas selvagens, o citoplasma do ovócito é repleto de vesículas (Figuras 9 e 10) com diferentes conteúdos (Lucci *et al.*, 2001; Mondadori *et al.*, 2007; Reader, 2007).

As células da granulosa contêm um núcleo que acompanha o formato da célula, com aglomerados de cromatina condensada e descondensada. Nas cabras há baixa densidade de organelas no citoplasma dessas células (Lucci *et al.*, 2001) e nas búfalas figuras mielínicas estão presentes (Mondadori *et al.*, 2007). Figuras mielínicas representam vesículas de digestão de estruturas velhas ou não-funcionais às células (Fawcett, 1966). No geral, não foram observadas junções especializadas entre as células da granulosa ou entre as células da granulosa e do ovócito, mas apenas uma justaposição entre elas.

Nesse estágio, substâncias requeridas para metabolismo energético do ovócito entram por difusão através de contato íntimo entre as membranas das células da granulosa e do ovócito ou ainda, são incorporados por endocitose. Isto pode ser observado pela presença de grande quantidade de *coated pits* no citoplasma de ovócitos bovinos de folículos primordiais (Fair *et al.*, 1995; Kacinskis *et al.*, 2005). Porém, Fair *et al.* (1997a) relataram junções Gap bem desenvolvidas entre células da granulosa adjacentes em bovinos.

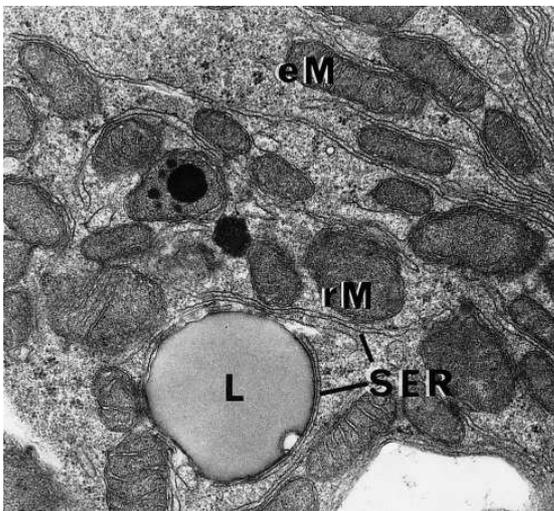


Figura 7. Ultramicrografia de folículo primordial bovino mostrando mitocôndrias redondas (rM) e alongadas (eM) em íntimo contato com retículo endoplasmático liso (SER) e gota lipídica (L). $\times 22.800$. **Fonte:** Fair *et al.* (1997a).

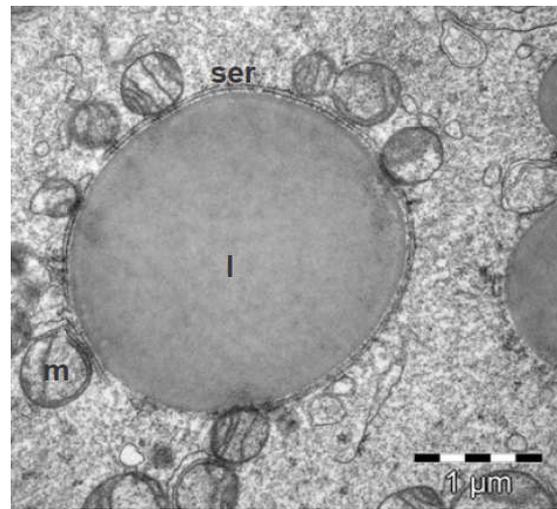


Figura 8. Ultramicrografia de folículo primordial de ovelha selvagem. Detalhe da interação entre gota lipídica (I), mitocôndria (m) e retículo endoplasmático liso (ser). **Fonte:** Reader (2007).

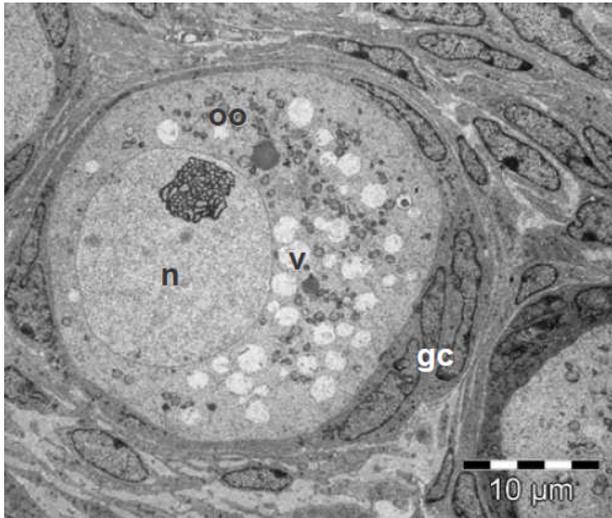


Figura 9. Ultramicrografia de folículo primordial de ovelha selvagem mostrando a presença de inúmeras vesículas no citoplasma do ovócito. Oo = ovócito, n = núcleo, gc = célula da granulosa, v = vesícula. **Fonte: Reader (2007).**

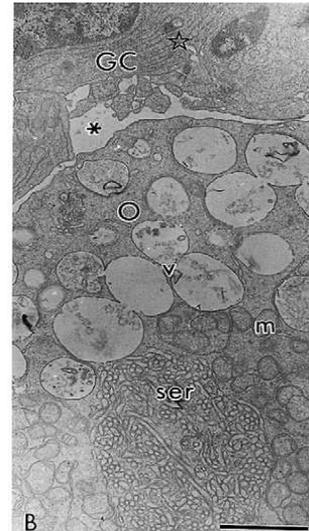


Figura 10. Ultramicrografia de folículos primordial bubalino mostrando abundância de vesículas (v) no ovoplasma e retículo endoplasmático rugoso nas células da granulosa (estrela aberta). bm = membrana basal; GC = célula da granulosa; O = ovócito; m = mitocôndria; ser = retículo endoplasmático liso Bar = 0.2μm. **Fonte: Mondadori et al. (2007).**

2.3.2 Folículo Primário

Nos folículos primários os ovócitos são predominantemente esféricos e apresentam citoplasma repleto de *coated pits*, vesículas, microvilosidades mitocôndrias redondas e algumas alongadas (vacas: Hyttel *et al.*, 1986; Fair *et al.*, 1997., Kacinskis *et al.*, 2005, ovelhas: Hay *et al.*, 1976, cabras: Sharma & Sawhney, 1999; Lucci *et al.*, 1999; 2001, gatas: Carrijo-Junior *et al.*, 2009, búfalas: Mondadori *et al.*, 2007; 2008 e mulheres: Bruin *et al.*, 2002; Westergaard *et al.* 2007).. Nos bovinos as mitocôndrias se localizam na região cortical do ovócito e existe uma grande quantidade de polirribosomos livres (Fair *et al.*, 1995). Em humanos, as organelas localizam-se mais próximas do núcleo (Figura 11) e a essa disposição dá-se o nome de corpos de Balbiani (Bruin *et al.*, 2002). Inúmeras vesículas grandes ocupam a maior parte do

citoplasma ovocitário de búfalas (Mondadori *et al.*, 2007). Nas gatas, as organelas se organizam em conglomerados (Carrijo-Junior *et al.*, 2009).

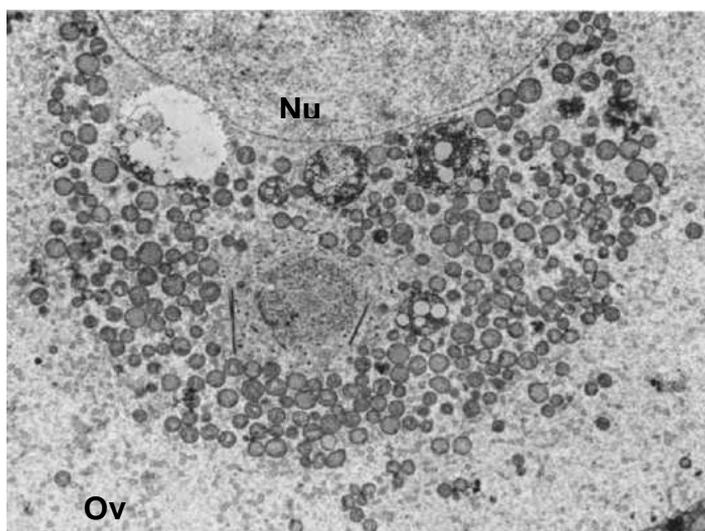


Figura 11. Ultramicrografia de folículo primário humano mostrando corpos de Balbiani. X3.800. Nu = núcleo, Ov = ovócito. **Fonte: Hertig & Adams, 1967.**

O citoplasma ovocitário ocupa todos os espaços entre ovócitos e células da granulosa, geralmente invadindo espaços entre duas células da granulosa (Lucci *et al.*, 2001; Kacinskis *et al.*, 2005; Mondadori *et al.*, 2007; Reader, 2007). Nesse estágio de desenvolvimento do folículo, sinais de zona pelúcida (Figura 12) são observados entre os ovócitos e as células da granulosa em búfalas (Mondadori *et al.*, 2007) e circundando o ovócito (Figura 13) de porcas da índia (Adams & Hertig, 1964), macacas (Zamboni, 1974), coelhas (Nicosia *et al.*, 1975), mulheres (Hilmelstein-Braw *et al.*, 1976), hamster (Oakberg, 1979), ovelhas selvagens (Reader, 2007) e gatas (Carrijo-Junior *et al.*, 2009). O citoplasma das células da granulosa possui mitocôndrias redondas, retículo endoplasmático, poucas vesículas e cisternas de Golgi (Lucci *et al.*, 2001). Junções aderentes são comuns entre ovócito e células da granulosa. Nos folículos que já possuem zona pelúcida, projeções das células da granulosa a

atravessam terminando botões onde são observadas junções Gap no ovoplasma. (Lucci *et al.*, 2001)

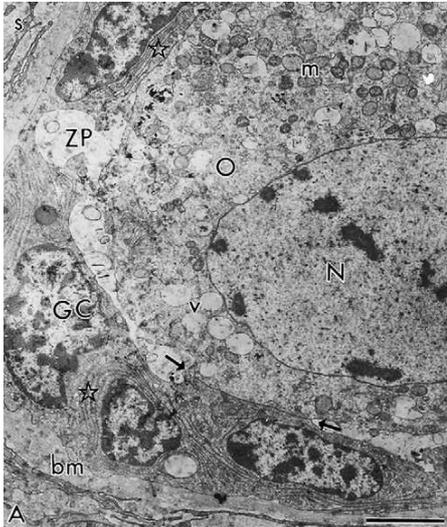


Figura 12. Ultramicrografia de folículo primário bubalino mostrando início de deposição de zona pelúcida (ZP) e justaposição de membrana do ovócito e células da granulosa (setas). bm = membrana basal; GC = célula da granulosa; O = ovócito; N = núcleo; m = mitocôndria, estrela aberta = retículo endoplasmático rugoso. Bar = 0,4 μ m
Fonte: Mondadori *et al.* (2007).

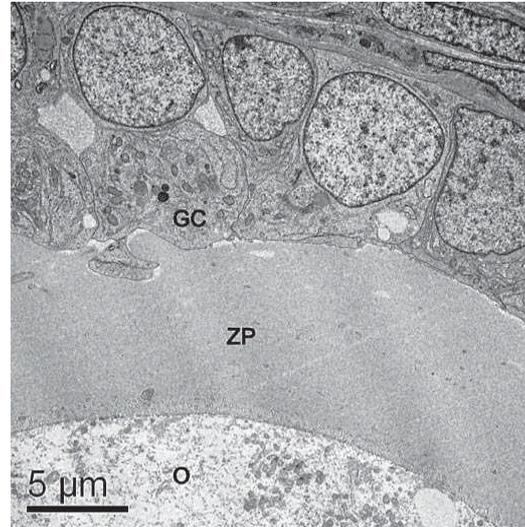


Figura 13. Ultramicrografia de folículo primário de gata mostrando zona pelúcida bem formada, GC = célula da granulosa; O = ovócito; ZP = zona pelúcida. **Fonte: Carrijo-Júnior *et al.* (2009).**

2.3.3 Folículo Secundário

Nos ovócitos dos folículos secundários o núcleo é grande, localiza-se na periferia da célula e apresenta nucléolo fribilo-granular (Figura 14). Os centros fibrilares invadem o nucléolo enquanto permanecem ligados à cromatina condensada. Esta característica é indício de atividade transcripcional (Fair *et al.*, 1997a). As organelas localizam-se na periferia do ovoplasma e são representadas pelas mitocôndrias redondas e alongadas, retículo endoplasmático e cisternas de Golgi bem desenvolvidas. Nos bovinos há

grande quantidade de gotas lipídicas (Fair *et al.*, 1995) e de figuras mielínicas no ovoplasma (Kaninskis *et al.*, 2005).

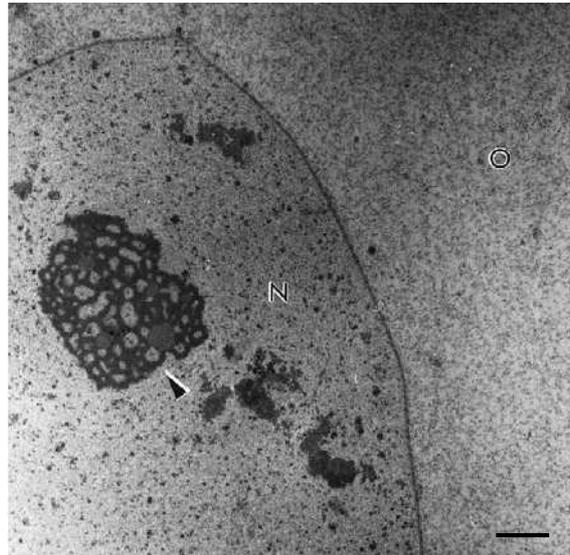


Figura 14. Ultramicrografia de ovócito de folículo secundário bovino. Presença de nucléolo fibrilo-granular (seta) N = núcleo, O = ovócito. Barra = 2 μ m.
Fonte: Adaptada de Kacinskis *et al* (2005).

Nessa fase do desenvolvimento a zona pelúcida já está formada ao redor do ovócito, exceto nas cabras e búfalas em que apenas sinais de zona pelúcida são observados (Lucci *et al.*, 2001; Mondadori *et al.*, 2007). O início da formação da zona pelúcida está relacionado com a presença de microvilosidades eretas nos ovócitos e com projeções das células da granulosa no ovoplasma. Quando a zona pelúcida está totalmente formada as projeções das células da granulosa terminam em botões no citoplasma do ovócito onde junções Gap (Figura 15) são visualizadas (Fair *et al.*, 1997). Junções Gap são responsáveis pela intercomunicação entre ovócitos e células da granulosa durante o desenvolvimento dos gametas femininos (Grazul-Bilska *et al.*, 1997). Por isso, nesse estágio de desenvolvimento do folículo os *coated pits* são encontrados em número bastante reduzido (Fair *et al.*, 1997). Há grande

número de vesículas elétron-lucentes no citoplasma de ovócitos e das células da granulosa em cabras e búfalas (Lucci *et al.*, 2001; Mondadori *et al.*, 2007). Lucci *et al.* (1999) sugerem que são vesículas secretoras carreando material para a síntese de zona pelúcida. A zona pelúcida é feita de glicoproteínas, as quais estão presentes no citoplasma de células foliculares (Wolgemuth *et al.*, 1984).

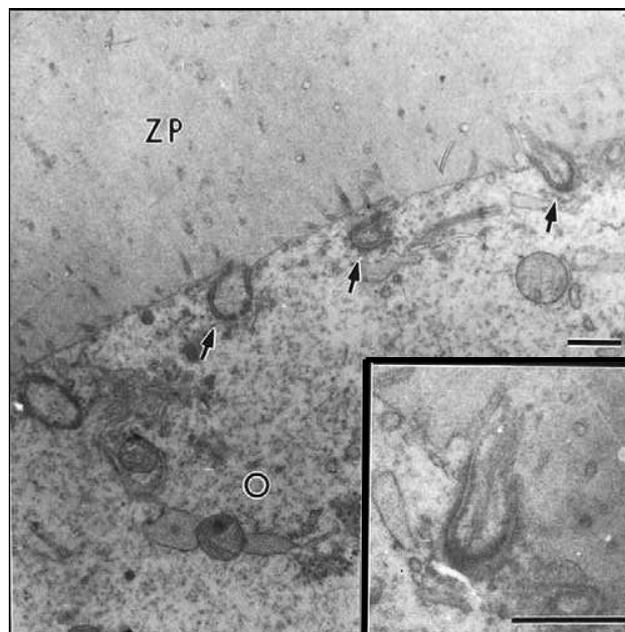


Figura 15. Ultramicrografia de folículo secundário bovino mostrando inúmeras projeções das células da granulosa terminando em junções Gap (setas). Uma visão mais próxima dessa junção pode ser vista no "inset". O = ovócito, ZP = zona pelúcida. Barra = 1µm. **Fonte: Kacinskis *et al.* (2005).**

Grânulos da cortical na região profunda do córtex ovocitário são vistos pela primeira vez na maioria das espécies. Nas gatas esses grânulos já se apresentam de forma alinhada. Esta disposição, associada à organização das organelas em conglomerados (Figura 16), indicam que nas gatas domésticas o

processo de maturação ovocitária ocorre precocemente (Carrijo-Junior *et al.*, 2009). Em outras espécies, essas características só foram encontradas em ovócitos durante maturação *in vitro* (bovino - Hyttel *et al.*, 1997, suíno - Sun *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004; Brevini *et al.*, 2007).

Ainda neste estágio, foi relatado que algumas células da granulosa apresentam formato colunar ao invés de cubóide em folículos de mulheres (Bruin *et al.*, 2002) e búfalas (Mondadori *et al.*, 2007). Em cabras, se observa a formação de espaços entre as células da granulosa, que posteriormente serão preenchidos por líquido folicular (Lucci *et al.*, 2001). Acúmulo progressivo de fluido provoca distensão dessas lacunas e formação do antro nos folículos antrais (Zamboni *et al.*, 1974).

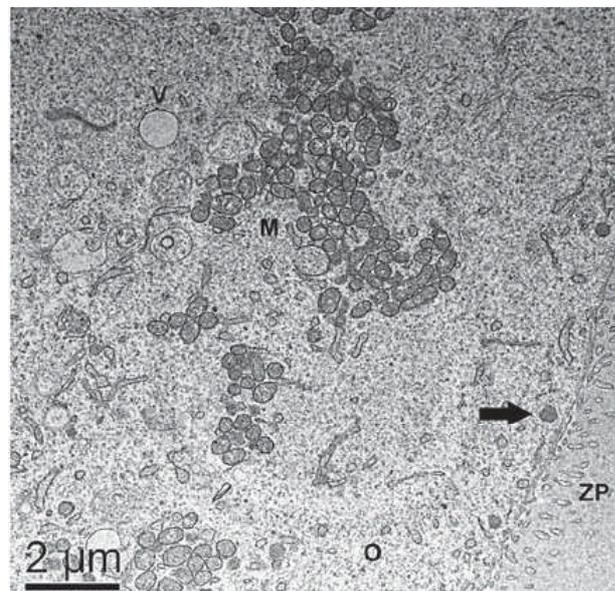


Figura 16. Ultramicrografia de folículo secundário de gata mostrando organelas organizadas em conglomerados e grânulos da cortical (seta) alinhados à membrana plasmática. M = mitocôndria, O = ovócito, V = vesícula, ZP = zona pelúcida. **Fonte: Carrijo-Júnior *et al.* (2009).**

2.3.4 Folículos Terciários

Em folículos terciários, todos os ovócitos são completamente circundados por zona pelúcida, a qual é atravessada por projeções das células da granulosa que formam indentações no oolema (Fair *et al.*, 1997). O citoplasma do ovócito é caracterizado pela presença de mitocôndrias pleomórficas e *hooded* (forma de capuz, Figura 17), e cisternas de Golgi bem desenvolvidas. Em folículos terciários de bovinos, mitocôndrias redondas e alongadas são predominantes (Fair *et al.*, 1997). Associações entre retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias e cisternas de Golgi são comuns, tornando a forma livre dessas organelas menos frequente. Além disso, os grânulos da cortical aparecem organizados em agregados na região profunda do córtex ovocitário (Figura 18). Ainda há grande quantidade de vesículas no ovoplasma, principalmente de búfalas (Mondadori *et al.*, 2008). Porém, os autores relataram que a maior parte dessas vesículas são de fato vacúolos lipídicos uma vez que não são circundadas por membrana (Figura 19). Grande quantidade de lipídeos em ovócitos de búfalas já foi confirmada pela adição do componente Tiol ao meio de maturação *in vitro* (Gasparrini *et al.* 2006, citado por Mondadori *et al.*, 2008).

Uma característica marcante em folículos terciários é a formação do espaço perivitelíneo associado à liberação de microvilosidades do ovócito da zona pelúcida (Figura 20) e de uma corona radiata compacta (Mondadori *et al.*, 2008). Nos ovócitos de búfalas de folículos de 6mm de diâmetro as organelas localizam-se na região perinuclear, sendo mitocôndrias na região cortical e os lipídeos na região medular (Mondadori *et al.*, 2008). Os autores sugerem que esta disposição denota uma alta taxa metabólica desses ovócitos, que tende a aumentar com o seu desenvolvimento e crescimento. As células da granulosa possuem núcleo com cromatina frouxa e citoplasma contendo retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. Segundo Mondadori *et al.* (2008) essas características mostram que há elevada síntese protéica, o que permite o crescimento e desenvolvimento do ovócito.

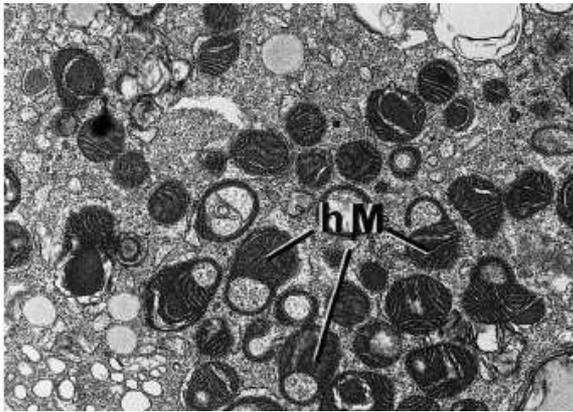


Figura 17. Ultramicrografia de folículo terciário bovino evidenciando mitocôndrias hooded (hM) x10.400 **Fonte: Fair et al. (1997)**

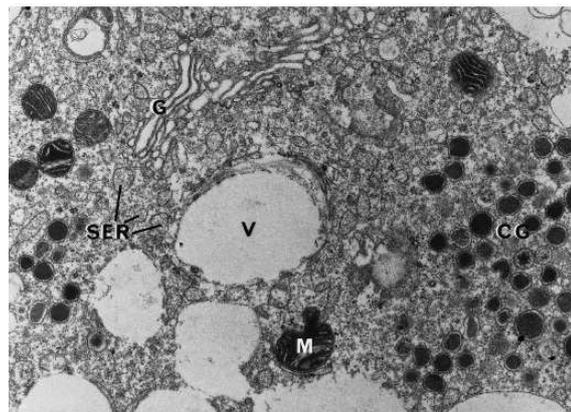


Figura 18. Ultramicrografia de folículo terciário bovino mostrando agregados de grânulos da cortical (CG). M = mitocôndria, G = Complexo de Golgi, SER = retículo endoplasmático liso, V = vesículas. X21.000. **Fonte: Fair et al. (1997)**

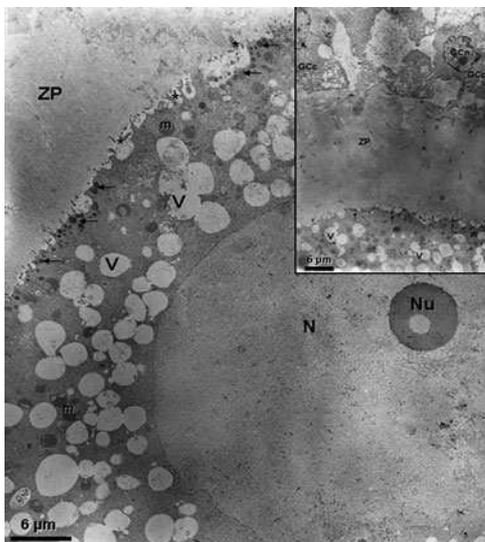


Figura 19. Ultramicrografia de ovócito de folículo antral bubalino mostrando a abundância de vacúolos contendo lipídeos (V). m = mitocôndrias, N = núcleo, Nu = nucléolo. **Fonte: Mondadori et al., 2008.**

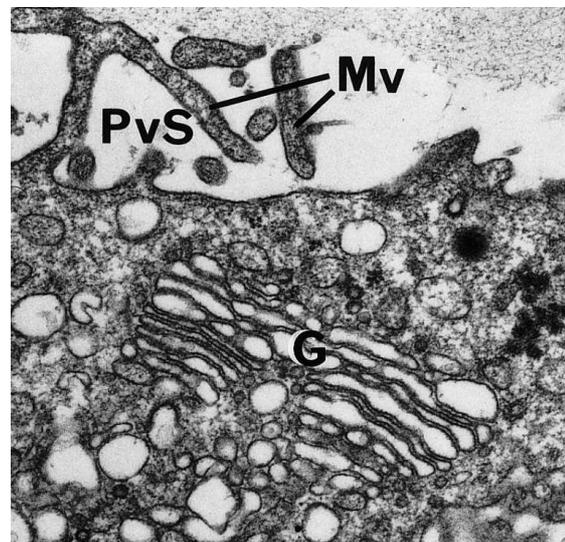


Figura 20. Ultramicrografia de ovócito de folículo antral bovino mostrando o espaço perivitelineo (PvS) e microvilosidades (Mv). G = complexo de Golgi. x26.400. **Fonte: Fair et al. (1997).**

2.4. Os lipídeos na reprodução

As células germinativas femininas de porcas possuem uma característica que chama muito a atenção: a presença de grande quantidade de lipídeos no citoplasma ovocitário de todas as classes foliculares. O que se tem discutido recentemente é até que ponto os tipos de lipídeos presentes no ovoplasma e não apenas a quantidade destes pode interferir na aplicação de algumas biotecnologias aplicadas aos gametas femininos. Para elucidar esta questão, é importante conhecer a estrutura, a função e a composição dos lipídeos nas células germinativas femininas.

2.4.1. Conceito, estrutura e função dos lipídeos

Os lipídeos, mais conhecidos como gorduras, são um grupo heterogêneo de compostos que possuem em comum o fato de não serem solúveis em água. Estas substâncias são encontradas de diferentes formas nos organismos vivos, como por exemplo: os óleos (ésteres formados a partir de ácidos graxos que se apresentam sob forma líquida), gorduras (ésteres formados a partir de ácidos graxos que se apresentam sob forma sólida), ceras (ésteres formados a partir de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa), além de esteróides (como o colesterol e hormônios sexuais), terpenos (geraniol), sabões, detergentes e sais biliares (Graziola *et al.*, 2002). Estes lipídeos, mesmo em baixas concentrações, podem ser co-fatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem luz, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (Lehninger *et al.*, 2000).

A estrutura fundamental dos lipídeos é composta de ácidos graxos ou estruturas diretamente a ele relacionadas, como os álcoois, aldeídos ou aminas. De fato, as gorduras naturais consistem de aproximadamente 95% de triglicerídeos ou triacilgliceróis, que consistem em três ácidos graxos esterificados ao glicerol (Figura 21). Os outros 5% são traços de

monoglicerídeos e diglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídios e esteróis. A hidrólise ácida dos triacilglicerídeos leva à liberação dos correspondentes ácidos carboxílicos – os ácidos graxos (Gunstone, 1996).

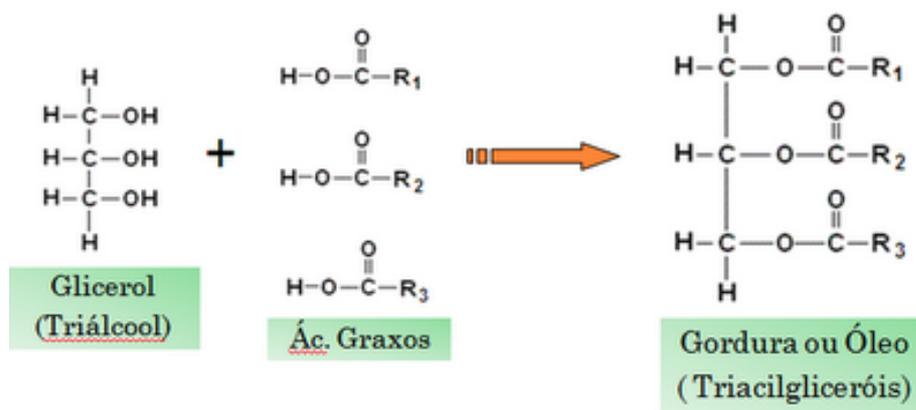


Figura 21. Esquema demonstrativo da reação de esterificação - formação de triacilgliceróis. **Fonte:** <http://duplat.blogspot.com/>

2.4.2. Os ácidos graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos que podem ser representados pela forma RCO₂H. Geralmente, o grupamento R é uma cadeia carbônica longa (com mais de 14 átomos de carbonos) não ramificada, com número par de átomos de carbono. Porém, essa cadeia pode ser ainda média (que possui entre 6 e 14 átomos de carbono) ou curta (com quatro ou menos átomos de carbono) (Belitz & Grosch, 1987). Podem ainda ser divididos em grupos no que concerne à sua estrutura química. Os que não contêm dupla ligação na sua estrutura são chamados saturados. Os insaturados contêm duplas ligações e se encontram sob duas formas: poliinsaturados, quando possuem mais de uma dupla ligação na sua estrutura, e monoinsaturados, com apenas uma dupla ligação (Peck, 1994). O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia R, a região apolar da molécula (Holum, 1994).

Todas essas características dos ácidos graxos estão relacionadas com as inúmeras funções biológicas exercidas por eles nas células. Por exemplo, as

membranas celulares são constituídas por fosfolipídeos, formados por duas moléculas de ácidos graxos (uma saturada e outra insaturada) esterificadas ao glicerol e um grupo fosfato. Estes ácidos graxos presentes nos fosfolipídeos são responsáveis pela manutenção da fluidez e função das membranas (Sumida *et al.*, 1993; Faergeman & Knudsen 1997). Lipídeos também podem ser encontrados na forma de estoque em todas as células mamíferas e este estoque tende a ser predominantemente de triglicerídeos compostos por cadeias de ácidos graxos monoinsaturados (Gurr & Harwood, 1991).

2.4.3. Lipídeos e os ovócitos

Os ovócitos de todos os mamíferos contêm lipídeos e esse conteúdo varia entre as espécies em termos de aparente abundância e utilização. Esta variação pode ser espécie-específica ou estar relacionada com fatores como o status fisiológico, o tipo de dieta do animal ou ainda, pela maturação do ovócito: se realizada *in vivo* ou *in vitro* (Adamiak *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2004). Altas concentrações de lipídeos na dieta, por exemplo, podem influenciar tanto o conteúdo de ácidos graxos de membranas celulares e citoplasma de ovócitos quanto o seu desenvolvimento e competência (Fouladi-Nashta *et al.*, 2007). Suplementação da dieta com gorduras tem aumentado o número total de folículos e estimulado o crescimento e o tamanho de folículos pré-ovulatórios (Mattos *et al.*, 2000). Além disso, o aumento de precursores dos ácidos graxos está diretamente relacionado à secreção de esteróides e eicosanóides que podem alterar a função ovariana e uterina e afetar a implantação embrionária (Wang & Dey, 2005).

Em um estudo realizado por McEvoy (2000) foi constatado que ovócitos de folículos antrais de porcas possuem três vezes maior quantidade de triglicerídeos em seu citoplasma quando comparado a ovócitos de ovelhas e vacas. Ácidos graxos saturados (média = 45-55%,) foram mais abundantes do que os mono- (27-34%) ou poliinsaturados (11-21%) nos ovoplasmas suínos. Além disso, observou-se no mesmo trabalho que existem diferenças na quantidade e proporção dos diferentes ácidos graxos presentes nas células germinativas de porcas, ovelhas e vacas. Dentre os ácidos graxos

poliinsaturados, o ácido araquidônico (20:4n-6; 1-3%) e o linoléico (18:2n-6; 5-8%) foram os mais abundantes nas 3 espécies. Outros trabalhos descrevendo perfil lipídico de ovócitos de diversas espécies já foram realizados. O ácido graxo saturado, denominado palmítico foi o mais encontrado em ovócitos de porcas (Homa *et al.*, 1986; Khandoker *et al.*, 1997; McEvoy *et al.*, 2000) e vacas (Khandoker *et al.*, 1997; McEvoy *et al.*, 2000). Todos esses estudos foram realizados com ovócitos provenientes de folículos ovarianos antrais, porém nenhum em folículos ovarianos pré-antrais.

O conteúdo lipídico de ovócitos e embriões é um parâmetro importante ligado à qualidade e criotolerância (Leroy *et al.*, 2005). Tem sido sugerido que a concentração de ácidos graxos poliinsaturados nos ovócitos imaturos de bovinos pode afetar a sensibilidade ao frio (Zeron *et al.*, 1999; McEvoy *et al.*, 2000) e que o aumento nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados durante o inverno influencia na resistência ao frio de ovócitos ovinos (Zeron *et al.*, 2003). Isso porque os lipídeos reagem de formas diferentes quando expostos a baixas temperaturas. Desta forma, cada ácido graxo muda do estado líquido para um estado gelatinoso em temperaturas específicas de congelamento. Isso ocorre, pois a cadeia hidrocarbonada de um ácido graxo saturado existe, geralmente, sob uma forma estendida, uma vez que esta sua conformação linear, flexível, é o estado de menor energia. Em contraste, os ácidos graxos insaturados contêm dobramentos rígidos em suas cadeias carbônicas, pois as duplas ligações não giram. A conformação linear dos ácidos graxos saturados permite um melhor empacotamento dos mesmos, fazendo com que as moléculas fiquem mais próximas umas das outras e, com isso, aumenta a interação entre elas. No caso dos ácidos graxos insaturados, a dupla ligação não permite um empacotamento tão eficiente das moléculas, fazendo com que as interações entre elas sejam menores. Como consequência, os ácidos graxos saturados possuem um ponto de fusão maior que os insaturados (Graziola *et al.*, 2002).

Correlacionando essas características com o processo de congelamento, ácidos graxos com duplas ligações (que dificultam o empacotamento dos fosfolipídeos, por exemplo) impedem sua cristalização (Alberts *et al.*, 2001). Na criopreservação de embriões, já foi demonstrado que a adição do ácido linoléico (AL), um ácido graxo poliinsaturado, ao meio de cultivo antes da criopreservação aumenta significativamente a sobrevivência

dos embriões bovinos produzidos *in vitro* após congelação-descongelação (Imai *et al.* 1997; Tominaga *et al.*, 2000). Esse efeito benéfico do AL sobre o desenvolvimento embrionário após congelação e descongelação pode ser devido a um aumento do conteúdo de ácidos graxos insaturados na membrana das células antes da criopreservação (Tominaga *et al.*, 2000). A fluidez da membrana em células vivas é determinada pela composição lipídica como o tamanho das cadeias de carbono e do nível de insaturação dos fosfolipídeos de membrana. Uma maior fluidez facilita perda de água pelas células durante o congelamento lento (Drobnis *et al.*, 1993). Por todos estes fatores a análise do perfil lipídico de ovócitos tem sido alvo de interesse.

3. Justificativa

Para que biotecnologias como a criopreservação possam ser largamente aplicadas com fins comerciais, é crucial conhecer a morfologia de ovócitos e folículos ovarianos. A caracterização morfométrica e ultraestrutural de folículos ovarianos já foi realizada em vacas (Hyttel *et al.*, 1986; Kacinskis *et al.*, 2005) ovelhas (Hay *et al.*, 1976), cabras (Sharma & Sawhney, 1999; Lucci *et al.*, 1999; 2001), gatas (Carrijo-Junior *et al.*, 2009), búfalas (Mondadori *et al.*, 2007; 2008) e mulheres (Bruin *et al.*, 2002; Westergaard *et al.* 2007). No entanto, as características morfométricas e ultraestruturais de folículos ovarianos de porcas ainda não foram totalmente descritas.

Além disso, a grande dificuldade em se preservar gametas femininos de porcas tem sido atribuída à presença de grande quantidade de lipídeo no ovoplasma suíno e a hipersensibilidade destes a baixas temperaturas. Sabe-se que existe um grupo heterogêneo de lipídeos e que há diferenças entre eles no quesito sensibilidade ao frio. Alguns estudos sobre a caracterização lipídica de ovócitos de gatas e cadelas (Guraya, 1965), vacas (McEvoy *et al.*, 2000), mulheres (Matorras *et al.*, 1998), ratas (Loewenstein & Cohen, 1964), coelhas (Khandoker *et al.*, 1996), ovelhas (McEvoy *et al.*, 2000) e porcas (Homa *et al.*, 1986, McEvoy *et al.*, 2000) têm sido realizados, porém todos estes estudos foram feitos em ovócitos provenientes de folículos antrais e não há na literatura

relatos em folículos ovarianos pré-antrais. Estabelecendo o perfil lipídico para os ovócitos suínos em diferentes estágios de desenvolvimento, o presente trabalho poderá contribuir identificando o estágio mais propício (que contenha menos lipídeos, ou ácidos graxos menos sensíveis) para aplicação de biotecnologias como a criopreservação de células germinativas femininas.

Assim, a união entre os conhecimentos da morfometria e ultraestrutura com a descrição detalhada do perfil de ácidos graxos de ovócitos e folículos ovarianos em suínos pode ser de fundamental importância para que novas tecnologias possam ser desenvolvidas com intuito de preservar o material genético de fêmeas geneticamente melhoradas. Este trabalho pode servir como modelo também para estudos visando a preservação de espécies nativas como Piau, Nilo, Pirapetinga, Caruncho, Casco de Mula, Rabo de Peixe e Monteiro, que se encontram em número cada vez mais reduzido (Mariante *et al.*, 2003) e que representam um grande potencial a ser explorado, devido às diversas características como rusticidade, adaptabilidade e resistência a doenças.

4.Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar morfométrica e ultraestruturalmente e descrever o perfil lipídico de ovócitos e folículos ovarianos de suínos em diferentes estágios de desenvolvimento.

4.2 Objetivos Específicos

- Descrever a morfometria e a ultraestrutura de folículos primordiais, primários e secundários suínos;
- Descrever a ultraestrutura de folículos terciários suínos;
- Quantificar e determinar os ácidos graxos presentes nas diferentes classes de folículos ovarianos de suínos (primordiais, primários, secundários e terciários).

5. Materiais e Métodos

5.1 Coleta e preparação dos ovários

Ovários de fêmeas suínas pré-puberes oriundas de cruzamento industrial foram coletados em abatedouro oficial (BONASA – Asa Alimentos) e transportados em solução salina a uma temperatura de 37 °C durante uma hora. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina e etanol 70%. Amostras de córtex ovariano foram retiradas para avaliação dos folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários). Folículos antrais (terciários) foram dissecados com o auxílio de uma lupa e pinças e divididos por diâmetro em três grupos: 1) até 2mm, 2) de 2 a 4mm, e 3) de 4 a 6mm.

5.2 Processamento para microscopia de luz

Apenas folículos pré-antrais foram avaliados por microscopia de luz. Pequenas amostras de córtex (1cm²) foram fixadas em solução de Carnoy (60% etanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) por quatro horas, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro, corados com Hematoxilina e Eosina e observados ao microscópio de luz Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Para descrição histológica, os folículos pré-antrais foram classificados da seguinte forma: folículos primordiais apresentaram um ovócito rodeado por uma camada de células da granulosa (CGs) achatadas ou achatadas e cuboidais; folículos primários apresentavam uma camada de CGs cuboidais e folículos secundários onde os ovócitos eram rodeados por duas ou mais camadas de CGs cuboidais. Medidas do diâmetro folicular, ovocitário e do núcleo do ovócito e contagem das células da granulosa foram obtidos de folículos ovarianos primordiais (N=113), primários (N=76) e secundários (N=27), sendo estas medidas realizadas apenas em folículos morfológicamente normais e com núcleo do ovócito visível. O programa utilizado para realização dessas mensurações foi o Image Pró-Plus 5.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland).

5.3 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Folículos pré-antrais e antrais foram processados para microscopia eletrônica de transmissão de rotina e para o método ósmio-imidazol (detecção de lipídeos). Pequenas fatias de córtex ovariano e os folículos antrais isolados foram fixados em Karnowsky (2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído e 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) por três horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%), ferricianeto de potássio (0,8%) e 5mM de CaCl₂, desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), infiltrados e incluídos em resina Spurr.

A detecção de lipídeos foi realizada utilizando o método do ósmio-imidazol. Amostras de córtex ovariano e de folículos antrais foram fixadas como descrito anteriormente, lavadas em tampão cacodilato (0,1M) e em seguida em tampão imidazol (0,1M). Na pós-fixação elas foram incubadas por 30 minutos em solução tetróxido de ósmio 2% em tampão imidazol (0,2M; pH 7,5). Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão imidazol, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), infiltrados e incluídos em resina Spurr.

Cortes semifinos (3 µm) foram corados com azul de toluidina e observados em microscópio de luz para localização dos ovócitos. Os cortes

ultrafinos (70 nm) foram coletados em telas de cobre e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011).

Para descrição ultraestrutural, as características do citoplasma de ovócitos e células da granulosa, presença e distribuição de organelas, membranas plasmática e nuclear e zona pelúcida foram observadas. Foram analisados folículos primordiais (N=10), primários (N=9), secundários (N=6) e terciários (N=14)

5.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos ácidos graxos presentes nos folículos pré-antrais e ovócitos de folículos antrais

Para este processamento os folículos ovarianos pré-antrais foram isolados do tecido utilizando-se o *Tissue Chopper* pela técnica descrita por Figueredo *et al* (1992), separados e purificados do restante do tecido utilizando-se micropipetas de vidro. Foi processado o conjunto ovócito e células da granulosa. Já os ovócitos imaturos inclusos em folículos antrais foram puncionados e apenas ovócitos com citoplasma de granulação fina e com várias camadas de células do cumulus ao seu redor foram selecionados utilizando-se para isso, um estereomicroscópio. Em seguida os ovócitos foram submetidos ao vórtex por 2 minutos para retirada de células do cumulus ou outras contaminantes. As amostras de folículos pré-antrais e de ovócitos oriundos de folículos antrais foram congelados (-20°C) em eppendorffs contendo PBS até o momento das análises.

O protocolo de extração de ácidos graxos livres seguiu o procedimento descrito por Folch *et al.* (1957). As amostras foram homogeneizadas em solução contendo clorofórmio (HCCl₃) e metanol (metOH) na proporção 2:1 e em seguida centrifugadas a 1000 rpm por 10 segundos para a separação em duas fases. A fase inferior foi transferida para outro eppendorf e a ela foram adicionados metOH, HCCl₃ e H₂O. Após uma segunda centrifugação na mesma rotação e tempo a fase aquosa foi retirada e a fase inferior foi misturada à fase orgânica da primeira extração. Em seguida foi acrescentado 0,5 mL da solução de Folch (48 metOH: 3 HCCl₃: 47 H₂O), a mistura foi homogeneizada no vórtex e a fase aquosa desprezada. Por fim, o solvente orgânico foi evaporado

utilizando um rotaevaporador (SPEEDVAC-100, Horizon). Em uma segunda etapa, esses ácidos graxos passaram por um processo de saponificação. As amostras extraídas foram ressuspensas em 2mL de NaOH 0,5M e deixados em banho-maria por 2h a 37°C. Feito isso foram adicionados 2mL de HCl e 1mL de n-hexano. A mistura foi homogeneizada em vórtex e a fase superior (contendo n-hexano) foi transferida para outro eppendorf. A solução foi novamente evaporada utilizando-se o rotaevaporador. Por fim, foi realizada a derivatização para HPLC. A amostra foi ressuspensa em 0,1mL de acetonitrila (ACN) e homogeneizada no vórtex. Em um tubo foram adicionados 0,04mL dessa suspensão, 0,02mL do reagente 1 (Brometil metóxi coumarina em ACN) e 0,02mL do reagente 2 (18 -crown-6-éter em ACN e carbonato de potássio) e submetidos a banho seco à 60°C por 15 min. A composição dos ácidos graxos presentes nas amostras foi obtida em sistema de HPLC, utilizando coluna para separação de lipídeos. As dosagens foram realizadas separadamente em dois grupos: folículos pré-antrais (Grupo 1) e ovócitos de folículos antrais (Grupo 2). Foram analisados 3000 folículos pré-antrais e 1000 ovócitos oriundos de folículos antrais.

5.5 Análise Estatística

Os dados das medidas de folículo, ovócito, núcleo do ovócito e do número de células da granulosa nas diferentes classes de folículo pré-antrais foram analisados por ANOVA e teste de Scheffe (StatView for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). As porcentagens dos ácidos graxos saturados e insaturados em folículos pré-antrais e ovócitos de folículos antrais foram comparadas pelo teste QUI-quadrado. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Histologia

Folículos primordiais consistiram de ovócito rodeado por células da granulosa achatadas ou achatadas e cuboidais (Fig. 22A). Células cuboidais quando presentes apareciam em pequeno número e geralmente em um dos pólos do folículo. Folículos primários apresentaram uma camada completa de células cuboidais ao redor do ovócito (Fig. 22B). Folículos secundários possuíam duas ou mais camadas de células da granulosa cuboidais (Fig. 22C).

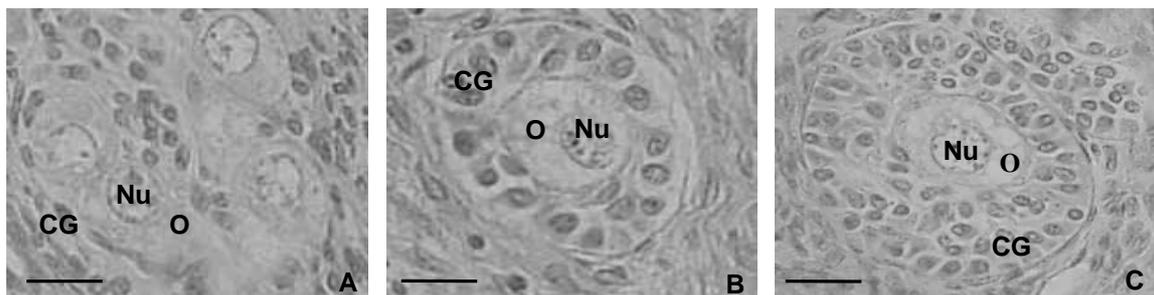


Figura 22. Fotomicrografias em microscopia de luz de folículos ovarianos primordiais (A), primário (B) e secundário (C) de suínos. O = ovócito, Nu = núcleo do ovócito e CG = célula da granulosa. Barra = 10 µm.

Os diâmetros de folículo, ovócito e núcleo do ovócito e o número de células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários de suínos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Diâmetros (μm) de folículo, ovócito e núcleo do ovócito e número de células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários de suínos. Média \pm desvio padrão (variação).

Classe Folicular	N	Diâmetro folicular	Diâmetro do ovócito	Diâmetro do núcleo	Nº de células da granulosa
Primordial	113	33,8 \pm 3,4 ^a (23-52)	26,0 \pm 2,5 ^a (18-36)	14,7 \pm 1,6 ^a (8-20)	5,2 \pm 2,4 ^a (1-17)
Primário	76	40,4 \pm 5,1 ^b (23-67)	27,3 \pm 2,8 ^b (20-38)	15,2 \pm 1,7 ^a (9-22)	8,4 \pm 3,9 ^b (1-22)
Secundário	27	84,5 \pm 15,1 ^c (36-142)	39,1 \pm 6,8 ^c (22-66)	19,6 \pm 3,6 ^b (11-34)	49,7 \pm 22,8 ^c (30-90)

Médias com diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$)

6.2 Microscopia eletrônica de transmissão

6.2.1 Folículo Primordial

Os folículos primordiais apresentavam ovócito de formato oval ou esférico, com citoplasma grande e homogêneo. O núcleo localizava-se no centro e seu formato era oval (Fig. 23a). A cromatina estava descondensada e algumas vezes eram observados nucléolos na periferia do núcleo.

As organelas concentravam-se principalmente próximas ao núcleo do ovócito, sendo que as organelas mais abundantes foram as mitocôndrias redondas. Estas apresentavam algumas cristas na periferia e outras que dividiam sua matriz em dois a quatro compartimentos. Grânulos elétron-densos (depósitos de cálcio) e/ou vacúolos no interior das mitocôndrias foram comumente observados (Fig. 23b). Mitocôndrias alongadas foram raramente observadas. Associados às mitocôndrias ou livres no citoplasma do ovócito

havia uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, que se caracterizavam por estruturas semelhantes a túbulos achatados.

Em todos os folículos primordiais analisados foram encontradas vesículas de secreção e digestão no ovoplasma. Cisternas do complexo de Golgi foram raramente observadas e geralmente estavam localizados bem próximos ao núcleo ovocitário. Gotículas de lipídeo estavam sempre presentes, normalmente localizadas em um dos pólos do ovócito (Fig. 23a) e encontravam-se, às vezes, envolvidas por retículo endoplasmático liso (Fig. 23b). Figuras mielínicas apareciam em pequena quantidade no citoplasma do ovócito. As membranas celulares do ovócito e da granulosa estavam em justaposição e foram observadas zonas de adesão e algumas microvilosidades entre essas membranas.

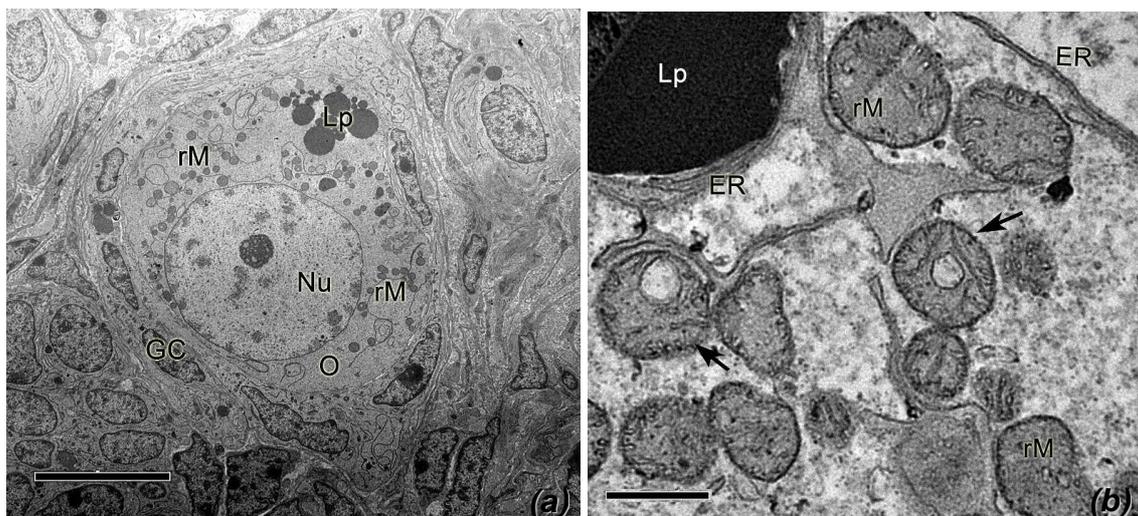


Figura 23. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão mostrando visão geral de folículo primordial (a). Em (b) são mostradas mitocôndrias circulares com (seta) e sem vacúolo. Nu = núcleo do ovócito, O = ovócito, CG = célula da granulosa, Lp = lipídeo, ER = retículo endoplasmático, rM = mitocôndria redonda. (a) Barra = 10 μm e em (b) Barra = 0.5 μm .

As células da granulosa apresentavam-se pavimentosas e seu núcleo ocupava quase 90% da célula. Esse núcleo possuía formato irregular ou alongado, com cromatina descondensada e alguns aglomerados de cromatina condensada e em algumas células eram observados nucléolos. Mitocôndrias

circulares e retículo endoplasmático liso eram as organelas predominantes no citoplasma das células da granulosa. Lipídeos também foram comumente observados (Fig 24).

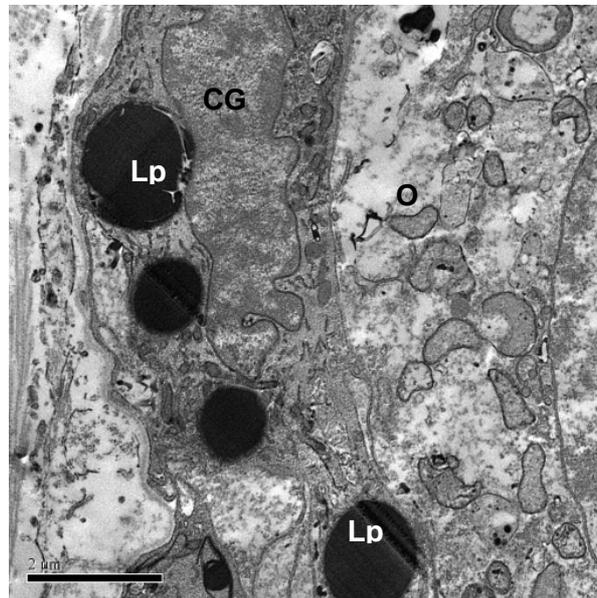


Figura 24. Fotomicrografia em microscopia eletrônica de transmissão mostrando gotas lipídicas nas células da granulosa de folículo primordial. Lp = lipídeo, O = ovócito, CG = célula da granulosa.

6.2.2 Folículo Primário

Os ovócitos de folículos primários apresentavam formato esférico e algumas vezes alongado com um núcleo central ou excêntrico e esférico. As organelas estavam mais bem distribuídas por todo ovoplasma (Fig. 25a) e este, geralmente invadia espaços entre duas células da granulosa. As mitocôndrias redondas ainda eram as organelas mais abundantes e cristas dividiam suas matrizes em compartimentos assim como nos folículos primordiais. Algumas mitocôndrias de formato alongado, retículo endoplasmático e complexo de Golgi também puderam ser observados. As gotículas de lipídeos formavam aglomerados na região cortical do citoplasma ovocitário. As junções entre as membranas do ovócito e células da granulosa eram mais freqüentes, sendo

observadas zonas de oclusão, de adesão (Fig 25b) e desmossomas. Especializações de superfície livre, como as microvilosidades puderam ser vistas no ovócito.

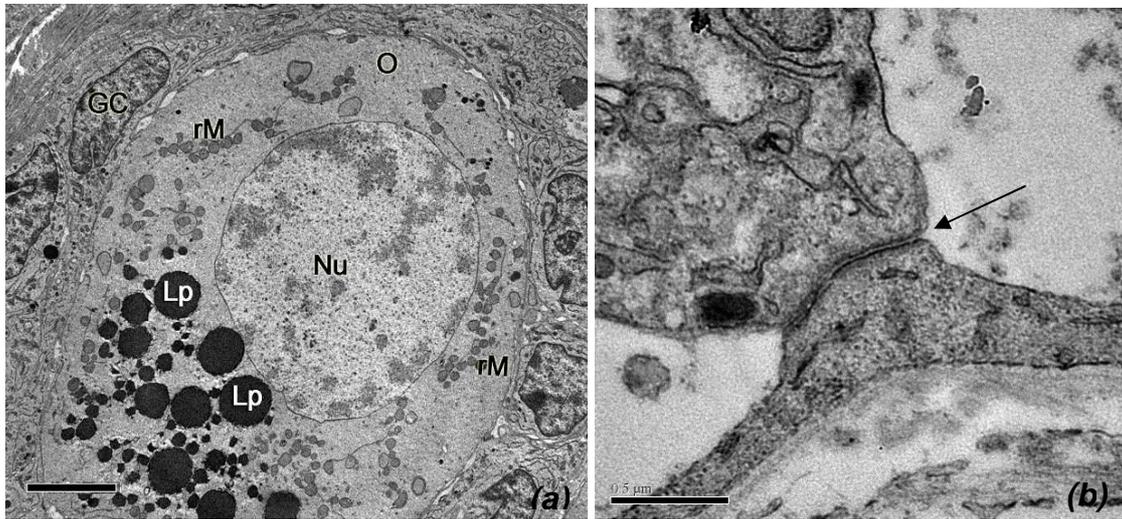


Figura 25. Fotomicrografia em microscopia eletrônica de transmissão mostrando visão geral de folículo primário (a). Em (b) pode ser observado junção de adesão entre células da granulosa (seta) Nu = núcleo do ovócito, O = ovócito, CG = célula da granulosa, Lp = lipídeo, rM = mitocôndria redonda. Barra = 5µm (a)

As células da granulosa eram cubóides e o núcleo acompanhava o formato da célula e possuía cromatina descondensada e aglomerados de cromatina condensada. A constituição do citoplasma das células da granulosa de folículos primários foi semelhante à de folículos primordiais com mitocôndrias redondas e retículo endoplasmático liso sendo as organelas predominantes. Lipídeos também foram comumente observados.

6.2.3 Folículo Secundário

Folículos secundários apresentavam ovócito e núcleo do ovócito esféricos, na maioria das vezes este se localizava na periferia assim como as organelas, havendo uma zona livre de organelas próximo ao núcleo do ovócito

(Fig 26a). Mitocôndrias redondas continuavam a ser as organelas mais abundantes, havendo a presença de algumas com formato alongado como observado nos folículos primários. Além disso, organizavam-se na forma de colar de pérolas (Fig. 26b). Cisternas de retículo endoplasmático liso apresentavam-se mais dilatadas em relação às encontradas nas outras duas classes de folículos ovarianos pré-antrais. Cortes transversais de retículo endoplasmático liso foram comumente observados. Além disso, retículo endoplasmático rugoso era bastante comum. Cisternas de Golgi foram raramente observadas, porém eram bem desenvolvidas e geralmente localizadas próximas ao córtex do ovócito (Fig 26c).

As estruturas mais evidentes e em maior quantidade encontradas no citoplasma do ovócito dos folículos secundários eram vesículas elétricas (Fig. 26a). Na maioria dos folículos secundários analisados foi observada a zona pelúcida, que formava uma espessa camada em torno de todo o ovócito. A zona pelúcida era atravessada por projeções das células da granulosa que terminavam em botões no citoplasma do ovócito onde junções Gap eram visualizadas (Fig 26d) Todas as células da granulosa possuíam formato cubóide e em seu citoplasma o retículo endoplasmático apresentava cisternas mais dilatadas e as mitocôndrias uma maior quantidade de cristas. Entre as células da granulosa pode ser observado início de formação de líquido antral.

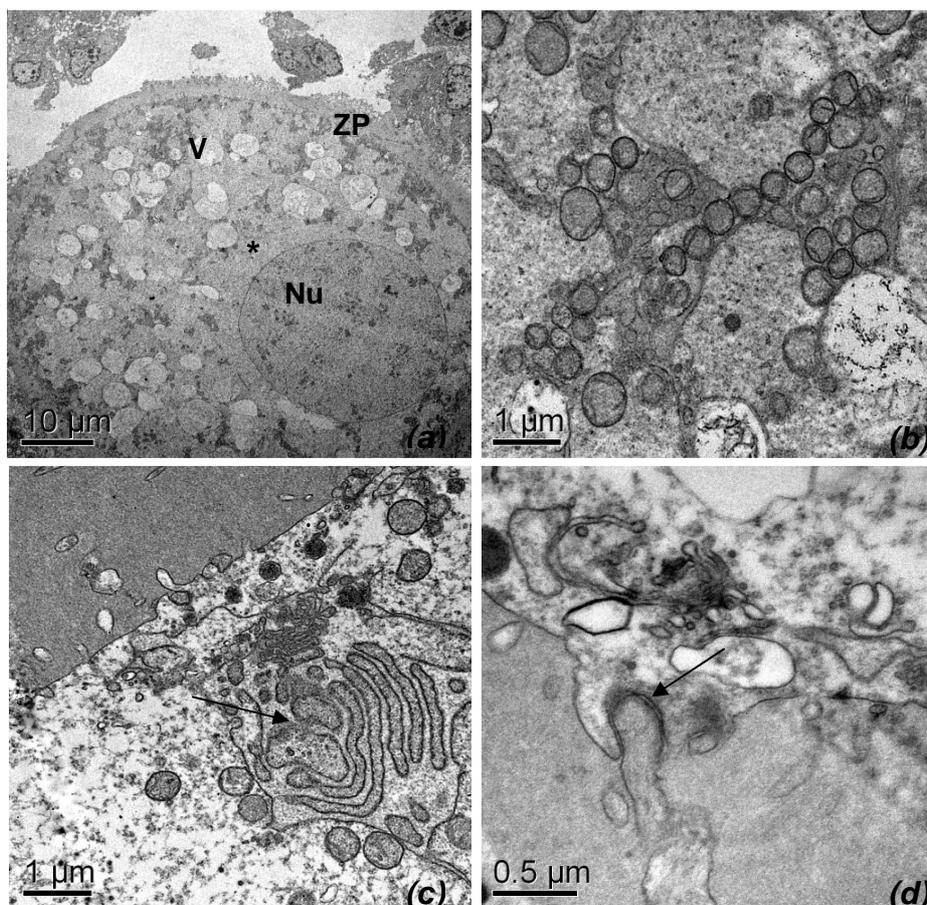


Figura 26. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão de folículos secundários suínos. Em (a) núcleo deslocado para a periferia do ovócito. Em (b) mitocôndrias organizadas em forma de colar de pérolas. (c) mostra complexo de Golgi (seta) localizado no córtex ovocitário e (d) projeção da granulosa atravessando a zona pelúcida e formando um botão (seta). Nu= núcleo, V = vesícula, ZP = zona pelúcida, * = zona livre de organelas próximo ao núcleo do ovócito

6.2.4 Folículos terciários

Nos cortes semifinos, os folículos terciários foram caracterizados por um ovócito circundado por multicamadas de células da granulosa cúbicas com cavidade antral entre elas. No geral, as três classes de folículos antrais (< 2mm; 2-4mm and 4-6mm) apresentaram ultraestrutura semelhante. O ovócito possuía formato esférico com um núcleo circular localizado na região periférica do citoplasma da célula. Todos os ovócitos eram circundados por uma espessa

zona pelúcida (Fig. 27b). Projeções das células da granulosa terminavam em indentações no oolema. As microvilosidades do ovócito penetravam a zona pelúcida (Fig 27a). O desenvolvimento do espaço perivitelíneo estava associado com a liberação das microvilosidades do ovócito na zona pelúcida, o que pode ser observado com maior freqüência nos folículos maiores que 2mm. Material extruso foi algumas vezes observado no espaço perivitelíneo (Fig 27b).

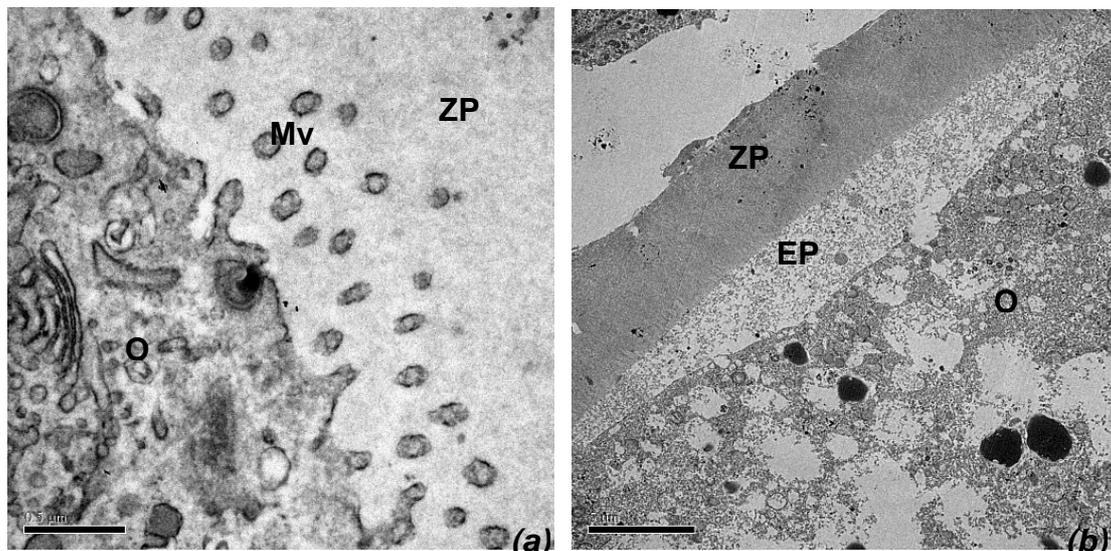


Figura 27. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão de folículo terciário suíno mostrando microvilosidades penetrando a zona pelúcida (a) e espaço perivitelíneo com material extruso (b). Mv = microvilosidades, O= ovócito, ZP = zona pelúcida, EP = espaço perivitelíneo.

Novamente, as mitocôndrias redondas eram as mais abundantes, porém algumas alongadas e pleomórficas puderam também ser observadas (Fig. 28b). O complexo de Golgi apresentava uma maior quantidade de cisternas, mas estas se apresentavam menos dilatadas. A forma livre de retículo endoplasmático liso e rugoso tornou-se menos evidente. O citoplasma dos ovócitos estava repleto de vacúolos elétron-lucentes (Fig. 28a). Essas estruturas geralmente estavam próximas às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático liso. *Coated pits* apareciam em quantidade reduzida em

ovócitos de folículos menores que 2mm e não foram observados nas outras classes de folículos antrais. Células da granulosa, agora denominadas de células do cumulus eram frouxamente organizadas e o retículo endoplasmático liso era a organela mais abundante.

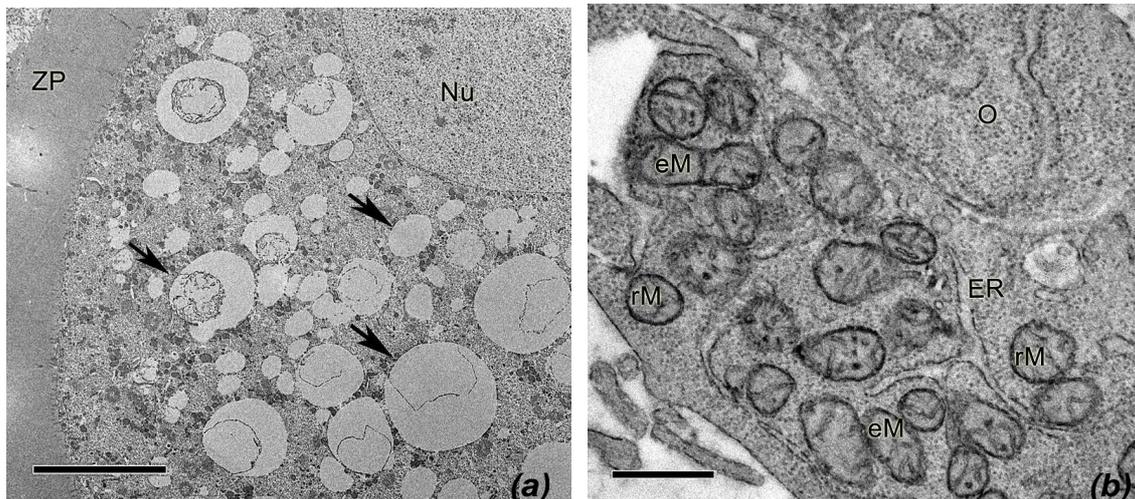


Figura 28. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão de folículo terciário suíno. Em (a) grande quantidade de vacúolos no citoplasma do ovócito (setas). Em (b) detalhe de mitocôndrias redondas e alongadas. O = ovócito, Nu = núcleo do ovócito, eM = mitocôndria alongada, rM = mitocôndria redonda, ER = retículo endoplasmático rugoso. (a) Barra = 10 μm e em (b) Barra = 0.5 μm .

6.2.5. Método ósmio-imidazol

Quando o método do ósmio-imidazol foi aplicado a folículos primordiais e primários, nenhuma diferença foi encontrada em relação aos aspectos das gotículas de lipídeo que se apresentaram como estruturas negras e redondas. Em contrapartida, nos folículos secundários e terciários, uma grande diferença pode ser observada antes e após a utilização do método ósmio-imidazol. Nos folículos secundários, as vesículas elétron-lucentes eram de fato gotas lipídicas que se apresentavam como estruturas redondas negras ou cinzas (Fig. 29a e b). Já nos os folículos terciários, os grandes vacúolos elétron-lucentes eram

gotas lipídicas ou vacúolos com conteúdo lipídico. Essas estruturas possuíam diferentes tamanhos, formatos e elétrons-densidades. Algumas eram gotas lipídicas negras com rajadas elétrons-lucentes no seu interior (Fig. 29c e d).

6.3 Perfil lipídico

Foram analisados apenas ácidos graxos não-esterificados, ou seja, ácidos graxos livres em um total de 15 ácidos graxos, sendo 8 saturados e 7 insaturados, representados na Tabela 2. Tanto nos folículos pré-antrais quanto nos ovócitos de folículos antrais os ácidos graxos saturados foram encontrados em maior porcentagem, 71,91% e 94,63%, do que os insaturados, 28,09% e 5,37%, respectivamente. ($P < 0,05$). Além disso, a quantidade de ácidos graxos saturados foi maior nos ovócitos dos folículos antrais do que nos folículos pré-antrais ($P < 0,05$).

Nos folículos pré-antrais, os ácidos graxos mais abundantes foram palmítico (40,11%) e esteárico (20,79%), ambos saturados. O terceiro mais abundante foi um ácido graxo de cadeia insaturada, o ácido oléico (10,19%). Já nos ovócitos de folículos antrais, os ácidos graxos palmítico e esteárico também foram os predominantes (49,29 e 33,35%, respectivamente). No entanto, o terceiro em maior quantidade foi também um ácido graxo saturado, o mirístico (6,75%)

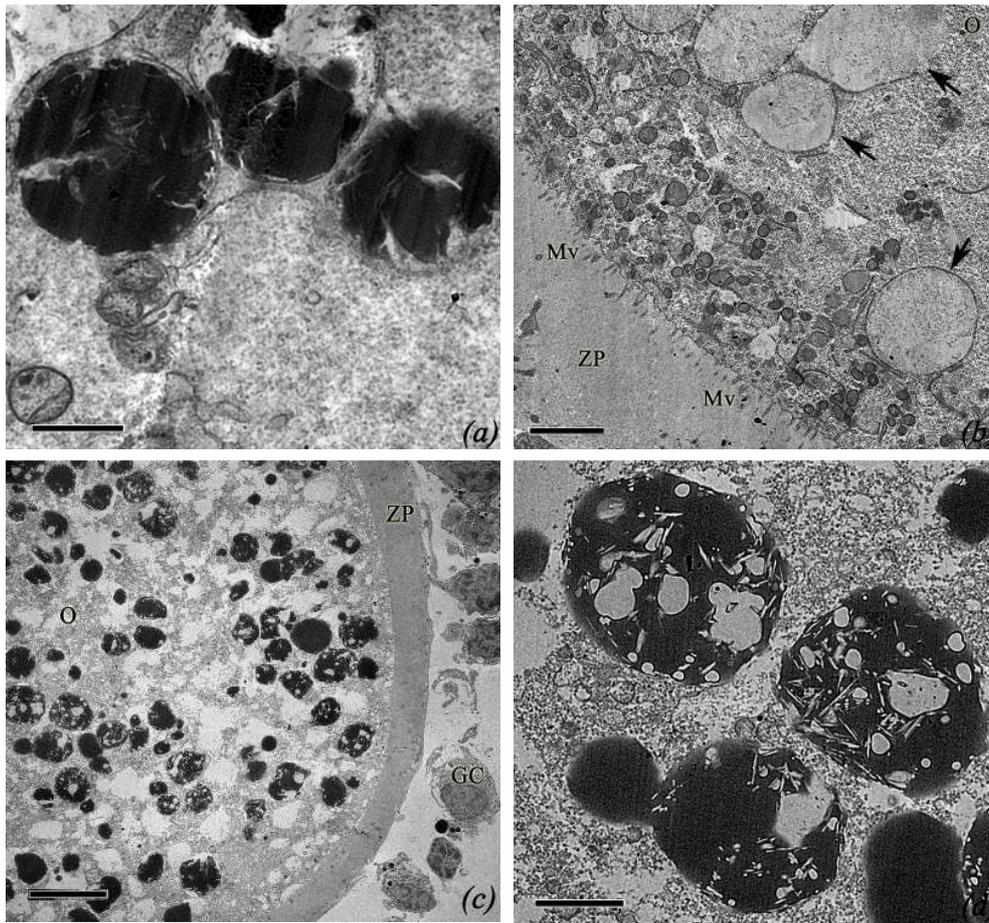


Figura 27. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão de folículos secundários (a-b) e terciários (c-d). Aparência escura (a) e cinza (b-setas) de gotas lipídicas após procedimento com ósmio-imidazol. Visão geral (c) do folículo apresentando gotas lipídicas de diferentes tamanhos, formatos e elétron-densidades após procedimento com ósmio-imidazol. Em (d) detalhe de gota lipídica escura com rajadas elétron-luscentes. Barras = 0.5 μ m (a), 5 μ m (b), 10 μ m (c) e 2 μ m (d).

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos livres em folículos pré-antrais e ovócitos de folículos antrais suínos.

Ácidos graxos	Fórmula	Folículo Pré-antral		Folículo Antral	
		%	ng*	%	ng*
Saturados	-	71,91^{Aa}	395,326	94,63^{Ab}	416,882
capróico	6:0	0,13	0,764	0,10	0,459
caprílico	8:0	0,38	2,156	0,21	0,943
cáprico	10:0	0,66	3,675	0,60	2,630
láurico	12:0	2,62	15,099	2,91	12,835
mirístico	14:0	5,41	30,348	6,75	29,750
palmítico	16:0	40,11	217,153	49,29	217,153
margárico	17:0-	1,82	10,132	1,40	6,174
esteárico	18:0	20,79	115,997	33,35	146,937
Insaturados	-	28,09^{Ba}	158,371	5,37^{Bb}	18,771
EPA	20:5 n-3	0,39	2,244	1,11	4,903
linolênico	20:3 n-6	0,00	0,000	0,00	0,000
DHA	22:5 n-3	0,12	0,792	0,02	0,105
AA	20:4 n-6	8,20 ^a	46,109	0,03 ^b	0,120
palmitoléico	16:1n-7	3,77 ^a	21,947	0,08 ^b	0,354
linoléico	18:2 n-6	5,42 ^a	30,622	1,91 ^b	8,423
oléico	18:1n-9	10,19 ^a	56,657	2,22 ^b	9,768
Total	-	100,00	553,698	100,00	440,557

* Dosagem em ng expressa por 1000 estruturas.

^{AB} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05).

7. Discussão

O presente estudo descreveu a morfometria de folículos ovarianos pré-antrais, a ultraestrutura e o perfil de ácidos graxos livres das diferentes categorias de folículos ovarianos de suínos.

No presente estudo, o diâmetro dos folículos pré-antrais e de seus ovócitos foi semelhante ao encontrado em outras espécies como vacas (Kacinskis *et al.*, 2005), marsupiais (Lintern-Moore *et al.* 1976), búfalas (Mondadori *et al.*, 2007) e gatas domésticas (Carrijo-Junior *et al.*, 2009), maior que o encontrado em cabras (Lucci *et al.*, 2001) e macacas prego (Domingues *et al.*, 2004) e menor que o encontrado em ovelhas (Lundy *et al.*, 1999). Alguns folículos secundários de 250 a 351 μm de diâmetro foram observados (dados não mostrados). Isso confirma que a formação de antro nos folículos ovarianos de porcas (400 μm - Morbeck *et al.*, 1992) ocorre tardiamente quando comparado com os de bovinos (200 μm - Figueiredo *et al.*, 1994).

O crescimento do folículo primordial suíno ao estágio de folículo terciário de 10mm de diâmetro é marcado pela diferenciação e proliferação das células da granulosa, formação de antro e aumento no diâmetro do ovócito de 30 μm a 120 μm (Morbeck *et al.*, 1992). O crescimento folicular em mamíferos ocorre em duas fases distintas e características. Na primeira fase, o crescimento do folículo e do ovócito coincide e está correlacionado de uma maneira positiva e, na segunda fase, o tamanho do ovócito permanece constante ao passo que as células da granulosa continuam a se proliferar (Hunter, 2000). No presente

estudo, foi observado crescimento coincidente do folículo e do ovócito na fase pré-antral.

Durante a foliculogênese inúmeras mudanças ultraestruturais ocorrem no citoplasma ovocitário. No geral, a ultraestrutura de folículos ovarianos de porcas foi semelhante à de outras espécies (humano - Oktay *et al.*, 1997; caprinos – Lucci *et al.*, 2001; bovinos – Lucci *et al.*, 2004; Kacinskis *et al.*, 2005; felino doméstico – Carrijo-Junior. *et al.*, 2009). O mesmo ocorreu com folículos antrais (bovinos - Fair *et al.*, 1997; búfalas – Mondadori *et al.*, 2007; ovelhas selvagens - Reader, 2007). No entanto, algumas diferenças puderam ser observadas, indicando que cada espécie possui características peculiares.

Mitocôndrias redondas foram as organelas mais abundantes no citoplasma dos ovócitos de todas as classes foliculares estudadas. Isso foi descrito em folículos pré-antrais de outras espécies como búfalos (Mondadori *et al.*, 2007) e bovinos (Kacinskis *et al.*, 2005). Porém, em cabras a maior parte das mitocôndrias encontradas em ovócitos de folículos secundários é alongada (Lucci *et al.*, 2001). No presente estudo, mitocôndrias alongadas e pleomórficas foram observadas em folículos terciários. Fair *et al.* (1997) sugerem que as mitocôndrias redondas sejam organelas imaturas das quais as outras formas derivam. Muitas mitocôndrias apresentaram grânulos elétron-densos e vacúolos no interior de sua matriz. Esses grânulos foram também descritos em mitocôndrias de ovócitos de vacas (Kacinskis *et al.*, 2005). De acordo com Fawcett *et al.* (1966), esses grânulos estão presentes em células transportadoras de íons encontradas no fígado, rim e pâncreas e estão relacionados ao controle iônico interno da mitocôndria. Gunter & Gunter (2004) descreveram que esses grânulos são depósitos de cálcio. Esses depósitos estão relacionados à existência de um grande potencial de membrana mitocondrial negativo.

Neste trabalho foram encontrados retículo endoplasmático liso e rugoso mais desenvolvidos em folículos secundários e terciários. O mesmo padrão foi observado nos ovócitos de búfalas (Mondadori *et al.*, 2007). O retículo endoplasmático liso tem funções em vários processos metabólicos como síntese de lipídeos e esteróides, metabolismo de carboidratos, regulação da concentração de cálcio (Maxfield & Wüstner, 2002). Considerando que ovócitos de folículos primordiais são quiescentes, retículo endoplasmático liso é mais

evidente em ovócitos em crescimento os quais apresentam intensa atividade metabólica como os folículos secundários e terciários. Da mesma forma, o retículo endoplasmático rugoso participa da síntese protéica incluindo a síntese das glicoproteínas da zona pelúcida (Dunbar *et al.*, 1994). É esperado que essa organela esteja mais desenvolvida em folículos secundários e terciários que possuem ovócito circundado por zona pelúcida. Uma intensa associação entre mitocôndria e retículo endoplasmático também foi encontrada. Essa associação indica uma relação fisiológica entre eles, sendo que a mitocôndria fornece energia para o crescimento e para as atividades do retículo endoplasmático (Bernhard & Rouiller, 1956).

O presente estudo mostrou que apenas em folículos secundários os ovócitos eram completamente circundados por zona pelúcida. Outros autores encontraram o mesmo em bovinos (Russe, 1983; Fair *et al.*, 1997). Entretanto, zona pelúcida foi observada circundando ovócitos de folículos primários de porcos da Índia (Adams and Hertig, 1964), macacos (Zamboni, 1974), coelhos (Nicosia *et al.*, 1975), humanos (Hilmelstein-Braw *et al.*, 1976) e hamster (Oakberg, 1979). Quanto mais espessa a zona pelúcida, maior o número de microvilosidades e projeções das células da granulosa. Essa grande quantidade de microvilosidades pode ser um meio pelo qual substâncias sejam transportadas entre células da granulosa e ovócito. Foi observado no presente trabalho que as projeções das células da granulosa terminavam em botões que possuíam junções Gap. Evidências indicam que as interações célula somática-ovócito via junções Gap são essenciais para o crescimento e metabolismo dos ovócitos. Essa é uma das rotas pelas quais as células da granulosa transmitem íons, nucleotídeos e aminoácidos para o ovócito (Anderson & Albertini, 1976; Herlands & Schutz, 1984). Em folículos primordiais e primários, os numerosos *coated pits* localizados na região cortical do ovoplasma de porcas do presente estudo, também já foram observados no ovoplasma de vacas (Fair *et al.*, 1997). Essas estruturas suprem a ausência de canais específicos de comunicação (Fair *et al.*, 1997).

Muitas vesículas, vacúolos e gotas lipídicas foram observados no citoplasma de ovócitos de porcas. Essas estruturas foram encontradas em diferentes tamanhos, formas, quantidades e elétrons-densidades em todas as classes de folículos. Existem controvérsias relacionadas ao conceito de

vesículas, vacúolos e gotas lipídicas. Vesículas estocam, transportam ou digerem produtos celulares. Muitas possuem funções especializadas dependendo do seu conteúdo. Vesículas são separadas do citosol por uma membrana semelhante à membrana plasmática e podem se fundir com essa membrana para liberar conteúdos para o meio extracelular ou se fundir com outras organelas celulares (para revisão veja Alberts, *et al.*, 2001). Nas células animais, vacúolos são estruturas que participam dos processos de endocitose e exocitose. Nestes processos vacúolos são simples vesículas de estoque que permitem o transporte de proteínas e lipídeos específicos para o meio extracelular. Eles são formados pela fusão de múltiplas vesículas e são simplesmente formas maiores destas. Vacúolos não possuem formato padrão e sua estrutura varia com as necessidades da célula (para revisão veja Brooker *et al.*, 2007). De acordo com Beller *et al.* (2008) gotas lipídicas são organelas que estocam lipídeos (maior parte na forma de triglicerídeos). Elas possuem uma estrutura simples circundada por uma monocamada de fosfolipídeos na qual muitas proteínas se ligam.

A maior diferença encontrada entre folículos ovarianos de porcas e de outras espécies é a grande quantidade de lipídeo intracelular presente no citoplasma dos ovócitos das porcas. Além disso, as células da granulosa também apresentaram uma grande quantidade de gotas lipídicas em seu citoplasma, principalmente em folículos primordiais e primários. Entre as classes foliculares, foram observadas ainda, diferentes características relacionadas aos lipídeos. Lipídeos são um grupo heterogêneo de estruturas que ocorrem naturalmente no ambiente como as gorduras, esteróides, vitaminas (como as vitaminas A, D, E K), monoglicerídeos, diglicerídeos, fosfolipídeos e outros. Algumas das funções realizadas pelos lipídeos incluem estoque de energia, componentes estruturais das células e como importantes moléculas sinalizadoras (Fahy *et al.*, 2005).

Este trabalho mostrou que o citoplasma de ovócitos de folículos primordiais e primários estava repleto de gotas lipídicas redondas e negras. Já nos ovócitos de folículos secundários e terciários foram encontradas inúmeras vesículas e vacúolos elétron-lucentes, respectivamente. Quando o método ósmio-imidazol foi utilizado, observou-se que estas estruturas eram de fato gotas lipídicas ou vacúolos contendo lipídeos. Enquanto nos folículos

primordiais e primários, as gotas lipídicas dos citoplasmas dos ovócitos permaneceram com mesmo aspecto e densidade utilizando a pós-fixação com ósmio ou com ósmio-imidazol, nos folículos secundários e terciários o aspecto elétron-denso só foi visto após marcação com imidazol. Imidazol é uma base orgânica fraca solúvel em água, álcool e lipídeos. O complexo ósmio-imidazol é eficiente para contrastar ácidos graxos saturados (Dickson & Meban, 1988). Ele ainda facilita a entrada do ósmio nas células, aumentando o contraste dos lipídeos insaturados (Hayat, 1993).

Foi mostrado ainda que, após o uso do complexo ósmio-imidazol, as gotas lipídicas nos ovócitos de folículos secundários eram estruturas negras ou cinzas, redondas e nos terciários estruturas negras com rajadas elétron-lucentes. Isachenko *et al.* (2001) descreveram dois tipos de gotas lipídicas em ovócitos de porcas em estágio de vesícula germinativa – vesículas negras e homogêneas e vesículas cinza com rajadas elétron-lucentes. Esses autores sugerem que isso seja consequência de lipólise citoplasmática e que as vesículas negras transformam-se nas cinzas após utilização dos lipídeos. Kikuchi *et al.* (2002) reportaram que a densidade das gotas lipídicas em ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro* diminui após a fertilização e é restaurada no estágio de pró-núcleo. Talvez, as diferentes necessidades energéticas dos ovócitos durante seu desenvolvimento estejam envolvidas no consumo dessas gotas lipídicas e conseqüentemente na mudança da sua natureza e aparência. Para comprovar essa hipótese, o presente trabalho analisou o perfil de ácidos graxos livres de folículos pré-antrais e de ovócitos de folículos antrais. Foi constatado que apesar dos ácidos graxos saturados terem sido mais abundantes em ambos os grupos, a proporção dos ácidos graxos insaturados nos folículos pré-antrais foi maior do que nos ovócitos de folículos antrais. Essa maior proporção de ácidos graxos insaturados nos folículos pré-antrais pode explicar o fato da contrastação das gotas lipídicas nos folículos pré-antrais ser tão evidente mesmo antes do processamento com o complexo ósmio-imidazol. Isso ocorre, pois o ósmio tem afinidade pelas ligações insaturadas dos ácidos graxos (Hayat, 1993).

Em um estudo comparativo, ovócitos de porcas provenientes de folículos antrais apresentaram duas vezes mais lipídeos que ovócitos de ruminantes (Mc Evoy *et al.*, 2000). A composição de ácidos graxos totais diferiu entre as

espécies e entre os grupos lipídicos (fosfolipídeos e triglicerídeos). No geral, os ácidos graxos saturados totais foram mais abundantes que os insaturados nos ovócitos suínos, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Ácido palmítico (saturado), ácido esteárico (saturado) e ácido oléico (insaturado) foram os mais abundantes em porcas (Homa *et al.*, 1986; McEvoy *et al.*, 2000), humanos (Matorras *et al.*, 1998) e coelhos (Khandoker *et al.*, 1996). O presente estudo analisou apenas ácidos graxos livres e também encontrou o ácido palmítico como o mais abundante tanto em folículos pré-antrais quanto nos ovócitos de folículos antrais. Um trabalho realizado por Homa *et al.* (1986) mostrou que a proporção dos tipos de ácidos graxos livres reflete a proporção dos ácidos graxos esterificados aos fosfolipídeos e triglicerídeos. Dessa forma, é possível inferir a proporção de ácidos graxos esterificados, presentes nos folículos e ovócitos, baseado na proporção de ácidos graxos livres. O ácido oléico (insaturado) foi o segundo ácido graxo mais abundante encontrado nos ovócitos de porcas representando 21,7% dos ácidos graxos totais (McEvoy *et al.*, 2000). Neste trabalho, o ácido oléico representou 10,19% do total de ácidos graxos nos folículos pré-antrais e apenas 2,2% nos ovócitos de folículos antrais. Esta divergência pode ser explicada por diferenças nas técnicas de extração lipídica ou ainda pelo tipo de dieta recebida pelos animais dos diferentes estudos (Wathes *et al.*, 2007). Altas concentrações de lipídeos na dieta podem influenciar o conteúdo de ácidos graxos de membranas celulares de ovócitos (Zeron *et al.*, 2001).

A quantidade e distribuição de lipídeos têm importantes implicações na sensibilidade de ovócitos e embriões a procedimentos de congelamento, uma vez que os lipídeos são sensíveis a baixas temperaturas, especialmente abaixo de 15°C (Didion *et al.*, 1990). Liebermann *et al.* (2002) relataram que lipídeos intracelulares causaram deformação e rompimento do citoesqueleto durante procedimentos de congelamento e vitrificação. Estas características tornam difícil a criopreservação de gametas de porcas (Pollard & Leibo, 1994). Baseado nos nossos resultados, os folículos pré-antrais podem ser uma alternativa para a criopreservação de material genético de porcas, uma vez que eles apresentam uma menor quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos e diferente composição de ácidos graxos quando comparados com os ovócitos de folículos antrais.

8. Conclusão

O trabalho descreveu a morfometria de folículos pré-antrais e a ultraestrutura de folículos pré-antrais e antrais suínos.

Mostrou que os lipídeos são abundantes em todas as classes de folículos ovarianos. e que inúmeras mudanças ocorrem no ovócito durante o desenvolvimento folicular.

Além disso, este trabalho revelou que os lipídeos são abundantes nos ovócitos de todas as classes de folículos ovarianos e que a composição desses lipídeos muda durante o estágio de desenvolvimento do ovócito.

9. Referências Bibliográficas

- ADAMIAK, S.J., MACKIE, K., WATT, R.G., WEBB, R., SINCLAIR, K.D. (2005). Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod* **73**, 918–926.
- ADAMS, E.C., HERTIG, A.T. (1964). Studies on guinea pig oocytes. Electron microscope observations on the development of cytoplasmic organelles in oocyte of primordial and primary follicles. *J. Cell Biol.* **21**, 397-427.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (2001). 'Molecular biology of the cell.' (Garland Science: Bethesda, MD).
- ANDERSON, E., ALBERTINI, D.F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* **71**, 680-686.
- BELITZ, H.U., GROSCH, W. (1987). *Food Chemistry*. Berlin: Springer Verlag, p. 128-199.
- BELLER, M., SZTALRYD, S., SOUTHALL, N., BELL, M., JÄCKLE, H., AULD, D.S., OLIVER, B. (2008). COPI Complex Is a Regulator of Lipid Homeostasis. *PLoS Biol.* **6**, 2530-2549.
- BERNHARD, W., ROUILLER, C. (1956). Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definitive phase of cellular activity. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* **2**, 73-78.
- BETTERIDGE, K.J., SMITH, C., STUBBING, R.B., (1989). Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *J Reprod. Fert.* p. 87-98.

- BEZERRA, MB., RONDINA, D., LIMA, AKF., OLIVEIRA, LC., CECCHI, R., LUCCI, CM., GIORGETTI, A., FIGUEREDO, JR., (1998). Quantitative and Qualitative aspects of pre-natal folliculogenesis in caprine species. *Ciênc Anim.* **8**, 47-56.
- BREVINI, TAL., CILLO, F., ANTONINI, S., GANDOLFI, F. (2007). Cytoplasmatic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim Reprod Sci* **98**, 23–38.
- BROOKER, RJ., STILING, PD., GRAHAN, LE., WIDMAIER, PE. (2007). 'Biology'. (Ed McGraw-Hill: New York).
- BRUIN, JP., DORLAND, SPEK., POSTHUMA, MER., VAN HAAFTEN, G., LOOMAN, M., TE VELDE, E.R. (2002). Ultrastructure of the Resting Ovarian Follicle Pool in Healthy Young Women. *Biol. Reprod.* **66**, 1151–1160 .
- CARRIJO-JUNIOR, OA., MARINHO, APS., CAMPOS, AA., AMORIM, CA., BÁO, S.N., LUCCI, CM. (2009) Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. *Cell. Tiss. Org.* (DOI: 10.1159/000225935)
- DE CAMPOS AA., MARINHO, APS., AMORIM CA., CARRIJO JÚNIOR O., LUCCI CM., (2007). Estimation of preantral ovarian follicle population of bitches and queens. In: XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007, Búzios - RJ. Anais do XXI Congresso da Sociedade
- DICKSON, GR., MEBAN, C. (1988). Use of imidazole – osmium tetroxide mixtures in the preservation of lung surfactant. *J. Anat.* **87**, 161:248.
- DIDION, B.A., POMP, D., MARTIN, M.J., HOMANCIS, G.E., AND MARKERT, C.L. (1990). Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.* **68**, 2803-2810.
- DOLEIEL, R., KYLIANKOVA, R., KUMMER, V., MA · KOVA, J., STARA, P., VITASEK, R. (2004). Follicular Population and Oestrogen Receptor Alpha in Ovary of the Bitch. *Acta Vet. Brno.* **73**, 37–43.

- DOMINGUES, FS., DINIZL, V., FURTADO, SHC., OHASHI, OM., RONDINA, D., SILVA, L.D.M. (2004). Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amazônica*. **34**, 495-501.
- DONOVAN, PJ., STOTT, D., CAIRNS, LA., HEASMAN, J., WYLIE, CC. (1986). Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* **44**: 831-8.
- DRIANCOURT, MA. (1991). Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, **35**, 55-63.
- DROBNIS, EZ., CROWE, LM., BERGER, T., ANCHORDOGUY, TJ., OVERSTREET, JW., CROWE, JH. (1993). *J.Exptl.Res.* **265**, 432-437.
- DUMOLLARD, R., DUCHEN, M., CARROLL, J. (2007). The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* **77**, 21-49.
- DUNBAR, BS., AVERY, S., LEE, V., PRASAD, S., SCHWAHN, D., SCHWOEBEL, E., SKINNER, S., WILKINS, B. (1994). The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 331-347.
- ENSINO DE QUÍMICA E NOVAS TECNOLOGIAS. Disponível em: <http://duplat.blogspot.com/> Acesso em 02/02/2010.
- ERICKSON, BH. (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim Sci*, **25**, 800-805.
- FAERGEMAN, NJ., KNUDSEN, J. (1997). Role of long chain fatty acyl-CoA esters In the regulation of metabolism and In cell signaling. *Biochem. J.*, **323**, 1-12.
- FAIR T. (1995). Oocyte growth in cattle: Ultrastructure, transcription and developmental competence. Department of Animal Science and Production. Dublin: University College Dublin, Thesis.
- FAIR, T., HULSHOF, SCJ., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M. (1997a). Nucleus Ultrastructure and Transcriptional Activity of Bovine Oocytes in Preantral and Early Antral Follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **46**, 208–215.

- FAIR, T., HULSHOF, SCJ., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M. (1997). Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat. Embryol.* **195**, 327–336.
- FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, HA. (2005). A comprehensive classification system for lipids *J. Lip. Res.* **46**, 839–861.
- FAWCETT, DW. (1966). 'An Atlas of Fine Structure—The Cell: Its Organelles and Inclusions.' (Ed.W.B. Saunders Company: Philadelphia and London).
- FIGUEREDO, JR., HULSHOF, SCJ., ECTORS, FJ. (1992). Mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. 8^o Reunion AETE, Lyon, Anais. p.152.
- FIGUEREDO, JR., HULSHOF, SCJ., VAN DER HURK, R., ECTORS, JF., BEVERS, MM., NUSGENS, B., BECKERS, JF. (1994). Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. *Theriogenology.* **41**, 1333-1346.
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, GHS. (1957). *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509
- FOULADI-NASHTA, ALI A., CARLOS, G., GUTIERREZ, JIN G., GONG, PHILIP C. (2007) Garnsworthy, and Robert Webb. Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows. *Biol. Reprod.* **77**, 9–17
- GASPARRINI, B., BOCCIA, L., MARCHANDISE, J., DI PALO, R., GEORGE, F., DONNAY, I., ZICARELLI, L. (2006). Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* **65**, 275–287.
- GIOMETT, IC., (2003). Cultivo de folículos pré-antrais. Monografia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil. 22p.
- GOSDEN, RG., TELFER, EE., (1987). Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zool. Lond.* **211**, 169-175.
- GOUGEON, A., CHAINY, GB. (1987). Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil* **81**, 433-42.

- GRAZIOLA, F., SOLIS, VF., CURI, R. (2002). Entendo a gordura – os ácidos graxos. In: Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. Ed Malole Ltda, São Paulo, p.7-23.
- GRAZUL-BILSKA, AT., REYNOLDS, LP., REDMER, DA. (1997). Gap junctions in the ovaries. *Biol. Reprod.* **57**,947–957.
- GUILBAULT, LA., DUFOURT, JJ., THATCHER, WW., DROST, M., HAIBEL, GK. (1986). Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fert.*, **78**,127-135.
- GUNSTONE, F. (1996). Fatty acids – nomenclature, structure, isolation and structure determination, biosynthesis and chemical synthesis. In : Fatty acids and lipid chemistry. Blackie Academic & Professional, Glasgow, p.35-39.
- GUNTER, KK., GUNTER, T.E. (1994). Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg. Biomembr.* **26**, 471-485.
- GURAYA, SS., GUPTA, SK. (1979). Morphology and Histochemistry of ovarian changes in the field rat. *Millardia melhada. Z.Mikrosk. Anat Forsch.*, **93**, 959-975.
- GURAYA, SS. (1985). Biology of ovarian Follicles in Mammals. Springer-Verlag, New York, pp.3-14.
- GURR, MI., HARWARD, JL. (1991). The nature of lipids and their place in living things. In Lipid Biochemistry 4th Edn pp 4–9 Eds MI Gurr and JL Harward. St Edmundsbury Press, UK
- HAY, MF., CRAN, DG., MOOR, RM. (1976). Structural Changes Occuring during Atresia in Sheep Ovarian Follicles. *Cell Tiss. Res.* **169**, 515-529.
- HAYAT, MA. (1993). 'Stains and cytochemical methods.' (Ed Plenum Publishing Corporation: New York).
- HERLANDS, RL., SCHULTZ, RM. (1984). Regulation of mouse growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes: in oocyte growth. *J. Exper. Zoo.* **229**, 317-325.
- HERTIG, AT., ADAMS, EC. (1967) Studies On The Human Oocyte And Its Follicle. *Tue Journal Of Cell Biology* **4**, 648-675.
- HILMELSTEIN-BRAW, R., BYSKOV, AG., PETER, H., FABER, M. (1976). Follicular atresia in the infant human ovary. *J.Reprod.Fertil.* **46**, 55-59.

- HIRSHFIELD, AN. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Intern. Rev. Cytol.*, 124:43-101.
- HOLUM, RJ. Lipids. (1994). In: Fundamentals of general, organic, and biological chemistry. John & Sons Inc, p.566-82.
- HOMA, ST., RACOWSKY, C., MCCAUGHEY, RW. (1986). Lipid analysis of immature pig oocytes *J. Reprod. Fert.* **77**, 425–434.
- HUNTER, MG. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *J. Reprod. Fert.* **5**, 122-130.
- HYTTEL, P., XU, KP., SMITH, S., GREVE, T. (1986). Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.*, **78**, 615-625.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* **4**, 23–32.
- ISACHENKO, V., ISACHENKO, E., MICHELMANN, JL., ALABART, I., VAZQUEZ, N., BEZUGLY, N., NAWROTH, F. (2001). Lipolysis and Ultrastructural Changes of Intracellular Lipid Vesicles after Cooling of Bovine and Porcine GV-oocytes. *Anat. Histol. Embryol.* **30**, 333-338.
- IMAI, K., KOBAYASHI, S., GOTO, Y., DOCHI, O., SHIMOHIRA, I. (1997). Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. *Theriogenology*, **45** (abstract).
- IRELAND JJ. (1987). Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fert.*, **34**, 39-54, 1987.
- JUNQUEIRA, LC., CARNEIRO, J. (1999). Histologia Básica. Ed.Guanabara & Koogan. 9 ed. 427p.
- KACINSKIS, MA., LUCCI, CM., LUQUE, MCA., BÀO, SN. (2005). Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* **47**, 45–57.
- KHANDOKER, M., TSUJII, H., KARASAWA, D. (1996) Fatty acid compositions of oocytes, follicular, oviductal and uterine fluids of rabbit. *Animal Science Technology (Japan)* **67**, 549-523.
- KIKUCH, IK., EKWALL, H., TIENTHAI, P., KAWAI, Y., NOGUCHI, J., KANEKO, H., MARTINEZ, RH. (2002). Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Zygote* **10**, 355–366.

- KOERING, MJ. (1969). Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in *Macaca mulatta*. *Am.J.Anat.*, **126**, 73-101.
- LEHNINGER, A., NELSON, DL., COX, MM. (2000). *Princípios de Bioquímica*, Sarvier, São Paulo.
- LEROY, JL., VANHOLDER, T., DELANGHE, JR., OPSOMER, G., VAN SOOM, A., BOLS, PE., DE KRUIF, A. (2004). Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* **80**, 201–211.
- LEROY, JLMR., GENICOT, G., DONNAY, I. (2005). Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile Red: a practical approach. *Reprod. Dom. Ani.* **40**, 76-78.
- LIEBERMANN, J., NAWROTH, F., ISACHENKO, V., ISACHENKO, E., RAHIMI, G., TUCKER MJ. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* **67**, 1671-1680.
- LINTERN-MOORE, S., MOORE, GPM. (1976). Tyndalebisc and marsupials. *Anat. Rec.*, **185**, 325-332.
- LOEWENSTEIN, JE., COHEN, AI. (1964). Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **12**, 113–121.
- LUCCI, CM., AMORIM, CA., RODRIGUES, APR., FIGUEIREDO, JR., BÃO SN., SILVA, JR., GONÇALVES, PBD. (1999). Study of preantral follicular population *in situ* and after mechanical isolation from undefined breed type goats at different reproductive stages. *Anim. Reprod. Sci.*, **56**, 223-236.
- LUCCI, CM., SILVA, RV., CARVALHO, CA., FIGUEIREDO, JR., BÃO, SN. (2001). Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin. Res.* **41**, 61–69.
- LUCCI, CM., KACINSKIS, MA., LOPES, LHR., RUMPF, R., BÃO, SN. (2004). Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology.* **61**, 1101-1114.
- LUNDY, T., SMITH, P., O'CONNELL, A., HUDSON, N.L., MCNATTY, KP. (1999). Population of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* **115**, 251–262.

- MARIANTE, AS., CASTRO, STR., ALBUQUERQUE, MSM. (2003). Pig biodiversity in Brazil. *Arch Zootec*, **52**, 245-248.
- MARINHO, APS., CAMPOS, AA., AMORIM, CA., CARRIJO-JÚNIOR, O., LUCCI, CM. (2007). Estimation of preantral ovarian follicle population of bitches and queens. In: XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007, Búzios - RJ. Anais do XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise.
- MATORRAS, R., RUIZ, JI., MENDOZA, R., RUIZ, N., SANJURJO, P., RODRIGUEZ-ESCUADERO, FJ. (1998) Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes *Human Reproduction* **13** 2227–2230
- MATTOS, R., STAPLES, CR., THATCHER, WW. (2000). Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Ver. Reprod.* **5**, 38–45.
- MAXFIELD, F.R, AND WÜSTNER, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* **110**, 891–8.
- MCEVOY, TG., COULL, GD., BROADBENT, PJ., HUTCHINSON, JS., SPEAKE, BK., (2000). Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* **118**, 163-170.
- MONDADORI, RG., LUQUE, MCA., SANTIN, TR., BÀO, SN. (2007). Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* **97**, 323–333.
- MONDADORI, RG., SANTIN, TR., FIDELIS, AAG., PORFÍRIO, EP., BÀO, SN. (2008). Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-antral Follicle Population and Ultrastructural Characterization of Antral Follicle Oocyte. *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01199.x
- MORBECK, D.E., ESBENSHADE, K.L., FLOWERS, W.L., AND BRITT, J.H. (1992). Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Bio. Fert. Reprod.* **47**, 485-491.
- NICOSIA, S.V., EVANGELISTA, I., AND BATTA, S.K. (1975). Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biol. Reprod.* **13**, 423–447.
- OAKBERG, E.F. (1979). Follicular growth and atresia in the mouse. *In vitro* **15**, 41-49.

- OKTAY, K., NUGENT, D., NEWTON, H., SALHA, O., CHATTERJEE, P., AND GOSDEN R.G. (1997). Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* **67**, 481–486.
- PECK, MD. (1994). Omega-3 polyunsaturated fatty acids: benefit or harm during sepsis? *New Horiz.*, **2**, 230-6.
- POLLARD, JW., LEIBO, SP. (1994). Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* **41**, 101-106.
- READER, KL. (2007). A Quantitative ultrastructural study of oocytes during the early stages of ovarian follicular development in Boorola and Wild-Type sheep. *Thesis*. Victoria University of Wellington, Wallaceville, New Zealand. 53 p.
- RICE, S., OJHA, K., MASON, H. (2008). Human ovarian biopsies as a viable source of pre-antral follicles. *Hum Reprod* **23**, 600-5.
- RIZZUTO, R., BERNARDI, P., POZZAN, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J. Physiol.* **1**, 37-47.
- RODGERS, R.J., IRVING-RODGERS, HF. (2009) The morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reprod. Fert.* REP-09-0177.
- ROSS, MH., ROMELL, LJ., KAYE, GI. (1995). *Histology: A Text and Atlas*. Ed. Williams & Wikins. 3 ed. 823p.
- RUSSE, I. (1983). Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl. Anat.* **24**, 77–92.
- SAUMANDE, J. (1981). Ovogenèse et folliculogénèse. *Rec. Méd. Vét.*, **157**, 29-38.
- SAUMANDE, J. (1991). La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec. Méd. Vét.*, **167**, 205-218.
- SHARMA, RK., SAWHNEY, AK. (1999). Fine morphology of membrane granulose in caprine ovary. *Ind. J. Anm. Sci.* **69**, 109-113.
- SUMIDA, C., GRABER, R.; NUNEZ, E. (1993). Role of fatty acids In signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglan. Leucocyte Essential Fat Acids*, **48**, 117-22.
- SUN, QY., WU, GM., LAI, L., PARK, KW., CABOT, R., CHEONG, HT., DAY, BN., PRATHER, RS., SCHATTEN, H. (2001) Translocation of active

- mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* **122**, 155–163.
- TOMINAGA, K., HAMADA, Y., YABUUE, T., ARIYOSHI, T. (2000) Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J. Vet. Med. Sci.* **62**, 465–467
- TORNER, H., BRUSSOW, KP., ALM, H., RATKY, J., POHLAND, R., TUCHSCHERER, A., KANITZ, W. (2004) Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre ovulatory maturation. *Theriogenology* **61**, 1675–1689.
- UNIVERSITÉ DU QUÉBEC Disponível em: www.uqtr.ca/Actualite/Entete. Acesso em 02/02/2010.
- VAN WEZEL, IL., RODGERS, RJ. (1996). Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol.Reprod.* **55**, 1003-1011.
- WANG, H., DEY, SK. (2005). Lipid signaling in embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 84–102.
- WASSERMAN, PM. (1994). The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.NEIL, JD (eds). *The Phys. Of Reprod.* Raven Press. p.571-628.
- WATHES, DC., ROBERT, D., ABAYASEKARA, E., AITKEN, JR. (2007) Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. *Biol. Reprod.* **77**, 190–201.
- WESTERGAARD, CG., BYSKOV, AG., ANDERSEN, CY. (2007). Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Hum Reprod* **22**, 2225-31.
- WOLGEMUTH, DJ., CELENZA, J., BUNGMAN, DS., DUNBAR, BS. (1984). Formation of the zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Develop. Biol.* **106**, 1-14.
- ZAMBONI, L. (1974). Fine morphology of the follicle wall and follicle cell–oocyte association. *Biol. Reprod.* **10**, 125–149.
- ZERON, Y, ARAV, A., SKLAN, D. (1999) Fatty acid composition in bovine immature oocytes. *Theriogenology* **51**, 311 (Abstract).
- ZERON, Y., OCHERETNY, A., KEDAR, O., BOROCHOV, A., SKLAN, D., ARAV, A. (2001). Seasonal changes in bovine fertility: relation to

developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* **121**, 447–454.

ZERON, Y., SKLAN, D., ARAV, A. (2002). Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 271–278.