



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KATIA CRISTINA FERNANDES DA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA RECUPERAÇÃO DE
COMPLEXO CUMULUS OÓCITO E DA POPULAÇÃO DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ENTRE FÊMEAS**

Bos taurus taurus* E *Bos taurus indicus

KATIA CRISTINA FERNANDES DA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA RECUPERAÇÃO DE
COMPLEXO CUMULUS OÓCITO E DA POPULAÇÃO DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ENTRE FÊMEAS**

Bos taurus taurus* E *Bos taurus indicus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal - Área de Concentração Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586e Silva, Kátia Cristina Fernandes da.

Estudo comparativo da recuperação de complexo cumulus oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* / Kátia Cristina Fernandes da Silva. – Londrina, 2009.

100 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal – Teses. 2. Folículos pré-antrais – Teses. 3. Vaca – Desenvolvimento folicular – Teses. 4. Oócitos – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.4

KATIA CRISTINA FERNANDES DA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA RECUPERAÇÃO DE
COMPLEXO CUMULUS OÓCITO E DA POPULAÇÃO DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ENTRE FÊMEAS
Bos taurus taurus E *Bos taurus indicus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal - Área de Concentração Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Evelyn Rabelo Andrade
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo
Universidade Estadual do Ceará

Londrina, 18 de fevereiro de 2009.

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Neusa, que sempre apoiaram minhas decisões e permitiram que eu chegasse até aqui.

Ao Gustavo, amor da minha vida, meu companheiro, que sempre esteve ao meu lado e nunca permitiu que eu deixasse de sonhar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir alcançar todos os meus objetivos e finalizar mais uma etapa na minha vida.

Agradeço ao Professor Marcelo, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade. Um amigo muito querido, sempre presente nos momentos mais difíceis. Obrigada por fazer parte da minha vida e me ajudar a ser uma pessoa/profissional melhor. A admiração que tinha do profissional que o senhor é tornou-se ínfima quando conheci a pessoa que está por trás do profissional!

À Dr^a. Evelyn, pela amizade e pelo auxílio durante o desenvolvimento do meu trabalho e contribuição durante a qualificação e defesa.

À Dr^a. Fabiana, pela amizade e pelo auxílio e contribuição nas correções na qualificação.

À Professora Maria Isabel, pela amizade e contribuição durante a qualificação.

Ao Professor José Ricardo de Figueiredo, da Universidade Estadual do Ceará, pela gentileza e prontidão em participar da banca de defesa.

Aos colegas do grupo do Laboratório de Reprodução Animal da UEL, Evelyn, Fabiana, Gustavo, José Henrique, Letícia, Lívia, Mariana, Marilu, Roberta, Thales e Wanessa, que acompanharam o desenvolvimento do meu trabalho.

À Empresa In Vitro Brasil, pelo fornecimento de dados.

À Renata, do Laboratório de Histologia da UEL.

À Professora Ana Paula, à Cláudia, Joelma, Raquel e Rita, do Laboratório de Anatomia Patológica da UEL, pela contribuição no processo de padronização da técnica histológica, auxílio na confecção das lâminas histológicas e documentação de imagens.

Ao João, do Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária da UEL.

À Professora Mara Rubin, da Embryolab, pelo auxílio na obtenção dos ovários.

Gostaria de agradecer também à Ana Carolina, Luciana, Melina e Wanessa, que contribuíram no início do trabalho e depois seguiram outros caminhos.

À Helenice, pelo carinho dedicado aos alunos da pós-graduação, e ao Professor Amauri, pelo constante esforço em melhorar a estrutura do Programa de Pós-graduação da UEL.

Aos amigos Alê, Ana Paula, Cintia, Denise, Dani, Flávia, “Feto”, Gilmar, Jake, Keila, Letícia, Luiz, Marcelo, Naka, Palumbo, Piero, Rebeca, Romerson, Thiago, Tonel....entre outros, que sempre me apoiaram e estiveram do meu lado. Vocês me deram muita força para seguir em frente!

À minha família e aos meus sogros, Carlos e Marlene, pelo apoio e carinho. À Luiza, pelo carinho e pela torcida.

Ao meu pai, Carlos (*in memoriam*), meu exemplo de vida, determinação e competência. E à minha mãe, Neusa, exemplo de garra e fé em Deus. Obrigada por permitirem que eu seguisse meu caminho para realizar meu sonho. Por fazer com que a distância física fosse apenas um detalhe, que contribuiu para nos tornar ainda mais unidos! Amo vocês! Pai, você foi o melhor amigo que já tive! Obrigada pelos ensinamentos e pelos momentos bons, que nunca serão esquecidos! Mãe, você é a minha fortaleza! Obrigada pelo carinho e doação, por estar do meu lado e apoiar minhas decisões.

E por último, gostaria de agradecer a Deus mais uma vez, pelo presente que recebi, que me ajudou a ser forte e me reergueu no momento mais difícil da minha vida. Gustavo, obrigada pela ajuda dedicada neste trabalho e em tantos momentos da minha vida nesses 5 anos e meio de convivência. A partir do momento que conheci você, passei a acreditar que almas gêmeas realmente existem. Voltei a sonhar por você, por amar você! Obrigada por me amar e me fazer tão feliz! Por acreditar em mim e por fazer com que meus problemas pareçam menores! Te amo mais que ontem, mas, com certeza, menos do que amanhã!

Obrigada!

“Pode-se vencer pela inteligência, pela habilidade ou pela sorte, mas nunca sem trabalho” (A. Detoeuf)

“A sorte não existe. O que as pessoas costumam definir como ‘sorte’ nada mais é do que o encontro da oportunidade com a capacidade” (Carlos Alberto da Silva)

**“Mostra-me, SENHOR, os teus caminhos, ensina-me tuas veredas. Faz-me caminhar na tua verdade e instrui-me, porque és o Deus que me salva, e em ti sempre esperei”
(Salmos, 25: 4-5)**

SILVA, Katia Cristina Fernandes. **Estudo comparativo da recuperação de complexo cumulus oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus***. 2009. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

No método *in vivo* de aspiração folicular, fêmeas *Bos taurus indicus* produzem um maior número de oócitos em relação a fêmeas *Bos taurus taurus*. Considerando que os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da reserva de folículos do ovário, uma provável explicação para esta diferença seria uma maior população folicular para fêmeas *indicus*. O objetivo deste trabalho foi comparar a população de folículos pré-antrais e a produção de oócitos de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*. Considerando-se a importância da foliculogênese para estudo da população folicular pré-antral e para a obtenção de oócitos, são discutidas novas teorias, como a renovação folicular pós-natal e a epigenética na origem e crescimento dos gametas femininos. Para a comparação da produção *in vivo* de oócitos, foram analisadas 5.407 aspirações foliculares. Obteve-se 90.086 oócitos de vacas Gir (*Bos indicus*), Holandesa (*Bos taurus*), 3/4 Holandesa x 1/4 Gir (*taurus x indicus*) e 1/2 Holandesa x 1/2 Gir (*taurus x indicus*). O número médio de oócitos totais e viáveis por procedimento foi 17,1±4,4 e 12,1±3,8 para vacas Gir (n=3.778), 11,4±3,9 e 8,0±2,6 para Holandesa (n=1.138), 20,4±5,8 e 16,8±5,0 para 3/4 Girolando (n=267), e 31,4±5,6 e 24,3±4,7 para 1/2 Girolando (n=224, p<0,01). Fêmeas *indicus* produziram mais oócitos do que fêmeas *taurus*, mas fêmeas 1/2 sangue *taurus x indicus* apresentaram a média mais elevada. A partir destes dados de produção de oócitos, fez-se uma comparação entre a população de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Aberdeen Angus). Ovários de fetos (n=10) e novilhas Nelore (n=12), e de fetos (n=10) e novilhas Aberdeen Angus (n=12) foram coletados em abatedouros e submetidos a processamento histológico para contagem de folículos pré-antrais. Não houve diferença entre o número médio de folículos pré-antrais presente nos ovários de fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* (p>0,05). O número médio de folículos pré-antrais por ovário foi 143.929±253 e 285.155±570 para fetos, *indicus* e *taurus*, e 76.851±280 e 109.673±293 para novilhas, *indicus* e *taurus* (p>0,05). A quantidade de folículos obtida por animal foi marcada por uma grande variação entre os indivíduos da mesma categoria e entre as raças. Considerando todos os dados obtidos, demonstrou-se que a produção de oócitos de fêmeas *Bos taurus* foi inferior a de fêmeas *Bos indicus*. No entanto, o número médio de folículos pré-antrais por ovário de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* foi semelhante. Deve existir outra diferença na fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*, excluindo-se a população folicular ovariana, que explique a alta produção de oócitos obtidos a partir de fêmeas *Bos indicus*.

Palavras-chave: População Folicular. Folículos Pré-antrais. Oócitos. *Bos indicus*. *Bos taurus*.

SILVA, Katia Cristina Fernandes. **Comparative study of cumulus oocyte complex recovery and the population of preantral follicles from *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* females.** 2009. 100p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

For *in vivo* oocyte recovery, *Bos taurus indicus* females produce a higher number of oocytes than *Bos taurus taurus* donor cows. Considering the preantral follicles represent about 90% of the ovarian pool of follicles, a possible explanation for this difference should be a bigger population of preantral follicles for *indicus* females. The aim of this work was to compare the population of preantral follicles and production of oocytes among *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. Considering the importance of folliculogenesis on preantral follicles and oocyte production, new hypothesis are commented, such as postnatal follicle renewal and epigenetics on origin and growth of female gametes. To compare the *in vivo* oocyte production, 5,407 ovum pick up were analyzed. We obtained 90,086 oocytes from Gir (*Bos indicus*), Holstein cows (*Bos taurus*), 3/4 Holstein x 1/4 Gir (*taurus x indicus*) and 1/2 Holstein x 1/2 Gir (*taurus x indicus*). The average number of total and viable oocytes per procedure was 17.1 ± 4.4 and 12.1 ± 3.8 for Gir ($n=3,778$), 11.4 ± 3.9 and 8.0 ± 2.6 for Holstein cows ($n=1,138$), 20.4 ± 5.8 and 16.8 ± 5.0 for 3/4 Holstein-Gir ($n=267$), and 31.4 ± 5.6 and 24.3 ± 4.7 for 1/2 Holstein-Gir ($n=224$, $p < 0.01$). *Indicus* females produced more oocytes than *taurus* donors, but 1/2 *taurus x indicus* females presented the highest average. From these data of oocyte production, we performed a comparison between the population of preantral follicles of *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Aberdeen Angus) females. Ovaries of Nelore fetuses ($n=10$) and heifers ($n=12$) and Aberdeen Angus fetuses ($n=10$) and heifers ($n=12$) were collected at slaughterhouse and subjected to histological processing for counting of preantral follicles. There was no difference between the average number of preantral follicles in the ovaries of *Bos indicus* and *Bos taurus* females ($p > 0.05$). The average number of preantral follicles per ovary was $143,929 \pm 253$ and $285,155 \pm 570$ for fetuses, *taurus* and *indicus*, and $76,851 \pm 280$ and $109,673 \pm 293$ for heifers, *taurus* and *indicus* ($p > 0.05$). There is a large variation of follicular pool between individuals in the same category and between the breeds. Taking all together, we showed that the oocyte production obtained from *Bos taurus* females was lower than those from *Bos indicus* donor cows. However, the average number of preantral follicles per ovary of *Bos taurus* and *Bos indicus* females was similar. We believe there is another difference in the reproductive physiology of *Bos taurus* and *Bos indicus* females, excluding the ovarian follicle population, which explains the high oocyte production obtained from *Bos indicus* females.

Keywords: Ovarian Follicular Population. Preantral Follicles. Oocytes. *Bos indicus*. *Bos taurus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Esquema ilustrando a origem das células da pré-granulosa durante a formação dos folículos primordiais..... 22
- Figura 2** – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Adaptado de Rodgers et al. 1999). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário 23

ARTIGO 1 – Desafios e Perspectivas da Foliculogênese

- Figura 1** – Estrutura esquemática do nucleossomo. DNA (vermelho) envolto no octâmero (verde) de histonas H2A, H2B, H3 e H4. H1: histona de conexão..... 49

ARTIGO 2 – Comparison of oocyte production among *Bos taurus*, *Bos indicus* and *indicus-taurus* donor cows

- Figure 1** – Production of oocytes per donor (\pm SEM) obtained from Gir, Black-and-White Holstein (BWH), 3/4 Holstein x 1/4 Gir, and 1/2 Holstein-Gir crossbreed donor cows. Means for the same characteristic differ statistically ($P < 0.01$)..... 63
- Figure 2** – Production of viable oocytes per donor (\pm SEM) obtained from Gir, Black- and-White Holstein (BWH), 3/4 Holstein x 1/4 Gir, and 1/2 Holstein- Gir crossbreed donor cows. Means for the same characteristic differ statistically ($P < 0.01$)..... 64
- Figure 3** – Estimated mean number of follicles (\pm SEM) present in the ovaries of donor cow at the time of ultrasound-guided follicular aspiration on the basis of a recovery oocyte rate of 80%. Means for the same characteristic differ statistically ($P < 0.01$)..... 65

ARTIGO 3 – Estimativa da população folicular ovariana pré-antral de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*

- Figura 1** – Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de fetos Nelore ($r=0,15$; $p>0,01$). Números de 1 a 10 representam os ovários..... 82
- Figura 2** – Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de fetos Angus ($r=0,94$; $p<0,01$). Números de 1 a 10 representam os ovários..... 83
- Figura 3** – Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de novilhas Nelore ($r=0,24$; $p>0,01$). Números de 1 a 12 representam os ovários..... 84
- Figura 4** – Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de novilhas Aberdeen Angus ($r=0,14$; $p>0,01$). Números de 1 a 12 representam os ovários..... 85
- Figura 5** – Secção histológica de ovário mostrando folículos poliovulados e cordões celulares. Folículos poliovulados no ovário de novilha Nelore (A) e de novilha Aberdeen Angus (B), e cordões celulares no ovário de novilha Nelore (C) e de feto Aberdeen Angus (D). Estruturas identificadas como sendo uma camada de células da granulosa (CG) envolvendo vários núcleos de oócito (Nu). Coloração PAS – Hematoxilina (400x)..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número médio de folículos pré-antrais por ovário de fetos (6-8 meses de idade gestacional) e novilhas (12-24 meses de idade) <i>Bos indicus</i> (Nelore) e <i>Bos taurus</i> (Aberdeen Angus).....	81
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP** – *Adenosine Triphosphate*- Trifosfato de Adenosina
- BMP** – *Bone Morphogenetic Protein*- Proteína Morfogenética Óssea
- BRG** – *Brahma Related Gene*- Gene relacionado ao BRM (Brahma)
- c-KIT** – *Cytokine receptor*- Receptor de citocina
- DNA** – *Desoxiribonucleic Acid*- Ácido desoxirribonucléico
- EGF** – *Epidermal Growth Factor*- Fator de Crescimento Epidermal
- FCS** – *Fetal Calf Serum*- Soro Fetal Bovino
- FGF** – *Fibroblast Growth Factor*- Fator de Crescimento de Fibroblasto
- FIV** – Fecundação *in vitro*
- FOPA** – Folículos Ovarianos Pré-antrais
- FSH** – *Follicle Stimulant Hormone*- Hormônio folículo estimulante
- GDF** – *Growth Differentiation Factor*- Fator de Crescimento e Diferenciação
- H** – *Histone*- Histona
- Hyal** – *Hyaluronidase*- Hialuronidase
- IATF** – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
- IGF** – *Insulin-like Growth Factor*- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
- INO** – *INOsitol requiring* – Requer Inositol
- ISWI** – *Imitation SWI* – Imitador de SWI
- IU** – *Internacional Unit* –Unidade Internacional
- K** – *Lysine*- Lisina
- LH** – *Luteinizing Hormone*- Hormônio Luteinizante
- LIF** – *Leukemia Inhibitory Factor*- Fator Inibidor da Leucemia
- LSD1** – *Lysine Specific Demethylase 1*
- MOET** – Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões
- MOIFOPA** – Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
- NURD** – *Nucleosome Remodeling and Deacetylase*- Deacetilase e remodelador de Cromatina
- Oct** – *Octamer*- Octâmero
- OPU** – *Ovum Pick Up*- Aspiração Folicular
- PAS** – *Periodic Acid-Schiff*- Ácido Periódico de Schiff
- PBS** – *Phosphate Buffer Solution*- Solução Tampão de Fosfato
- PCNA** – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*- Antígeno Nuclear de Células Proliferativas
- PIV** – Produção *in vitro*
- Scp** – *Synaptonemal Complex Protein*- Proteína do Complexo Sinaptonemal
- SNF** – *Sucrose Non Fermenting gene*

SWI – *SWItch gene*

TCM – *Tissue Culture Medium*- Meio de Cultivo de Tecido

TE – Transferência de Embriões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 HIPÓTESE	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1 O OVÁRIO MAMÍFERO	20
4.1.1 Aspectos Morfológicos e Estruturais do Ovário.....	20
4.1.2 População Folicular Ovariana.....	21
4.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.....	21
4.3 FOLÍCULOS OVARIANOS	23
4.3.1 Classificação e Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Ovarianos.....	24
4.3.1.1 Folículos Primordiais	25
4.3.1.2 Folículos Primários	25
4.3.1.3 Folículos Secundários	26
4.3.2 Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Antrais	26
4.4 ATRESIA FOLICULAR	27
4.5 RENOVAÇÃO FOLICULAR	28
4.6 FISILOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS	29
REFERÊNCIAS	31
5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	40
ARTIGO 1 – DESAFIOS E PERSPECTIVAS DA FOLICULOGÊNESE	40
RESUMO	41
ABSTRACT.....	42
INTRODUÇÃO.....	43
CONCEITOS BÁSICOS DA FOLICULOGÊNESE	44
NOVOS CONCEITOS EM FOLICULOGÊNESE EPIGENÉTICA E FOLICULOGÊNESE.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ARTIGO 2 – COMPARISON OF OOCYTE PRODUCTION AMONG BOS TAURUS, BOS INDICUS AND INDICUS-TAURUS DONOR COWS	56
ABSTRACT.....	58
1 INTRODUCTION	59
2 MATERIALS AND METHODS.....	60
2.1 ANIMALS.....	60
2.2 DONOR PREPARATION.....	61
2.3 FOLLICLE ASPIRATION	61
2.4 OOCYTE EVALUATION	61
2.5 STATISTICAL ANALYSIS.....	62
3 RESULTS	62
4 DISCUSSION	66
REFERENCES	70
ARTIGO 3 – ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA PRÉ- ANTRAL DE FÊMEAS OS TAURUS INDICUS E BOS TAURUS TAURUS	74
RESUMO	75
1 INTRODUÇÃO.....	76
2 MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1 COLETA DOS OVÁRIOS	78
2.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	78
2.3 MORFOMETRIA DOS FOLÍCULOS OVARIANOS	79
2.4 QUANTIFICAÇÃO FOLICULAR.....	79
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	80
3 RESULTADOS	81
4 DISCUSSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	93
6 DISCUSSÃO GERAL	98
7 CONCLUSÕES	100

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o primeiro país do mundo em número de embriões produzidos *in vitro*. Durante o ano de 2006, o Brasil foi responsável por mais de 2/3 do total de embriões produzidos *in vitro* no mundo, aproximadamente 132.000 embriões, e mais de 70.000 embriões foram gerados pelo método *in vivo* (THIBIER, 2007). Apesar do expressivo número de embriões obtidos por lavagem uterina, verifica-se uma clara tendência de continuidade ao aumento de embriões produzidos *in vitro*. No Brasil, a produção *in vitro* de embriões (PIV) é muitas vezes a primeira opção para a multiplicação de animais de interesse zootécnico e/ou comercial, e isto certamente tem correlação com o predomínio de animais zebu (*Bos taurus indicus*) no plantel brasileiro. Para fêmeas Nelore, a mais numerosa raça do Brasil, admite-se uma maior quantidade de embriões por procedimento com a PIV, quando comparada à coleta e transferência de embriões (PONTES et al., 2009). A valorização da raça Nelore, o grande número de laboratórios privados com domínio da PIV no Brasil e interesse de outros países em adquirir genética *Bos indicus* do Brasil justificam esse cenário (NASSER et al., 2008). Além disso, a elevada produção de oócitos obtida naturalmente a partir de fêmeas da raça Nelore certamente contribui para este cenário.

Considerando outros aspectos reprodutivos, as divergências entre *Bos taurus taurus* (*Bos taurus*) e *Bos taurus indicus* (*Bos indicus*) não se apresentam tão discrepantes. Há diferenças moderadas entre o tamanho do trato reprodutivo e divergência folicular (ADAYEMO; HEATH, 1980; SARTORELLI et al., 2005). Quanto à obtenção de embriões pela lavagem uterina, as médias obtidas são similares (CASTRO-NETO et al., 2005). No entanto, quanto ao número de oócitos, fêmeas Nelore produzem, em média, 18 a 25 oócitos por sessão de aspiração folicular (WATANABE et al., 1999; THIBIER, 2004; RUBIN et al., 2004). Esta média de oócitos por sessão é maior comparada à produção obtida de vacas de raças taurinas (4-14 oócitos; MACHADO et al., 2003; RUBIN et al., 2005; MARTINS Jr et al., 2007).

Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas *Bos indicus* capazes de produzir centenas de oócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de 251 (SENEDA et al., dados não publicados) e até 564 oócitos obtidos em um único procedimento de aspiração folicular (SANTOS et al., 2005). Para essas fêmeas de extraordinária produção, a possibilidade de três ondas de crescimento folicular permitira a projeção de mais de 1.000 folículos recrutados em apenas um ciclo estral, o que certamente é algo inusitado.

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representam cerca de 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e são responsáveis pela renovação contínua de

folículos antrais no ovário (GUILBAULT et al., 1986). Uma estimativa de um trabalho clássico da população folicular ovariana em fêmeas *Bos taurus* cita o número de 200.000 folículos primordiais por ovário (ERICKSON, 1966). No entanto, considerando que mais de 99,9% dos folículos sofrem atresia (CARROL et al., 1990), principalmente na fase pré-antral, nota-se uma discrepância entre o total de folículos atribuídos a *Bos taurus* e os dados de oócitos obtidos *in vivo* de fêmeas *Bos indicus* (SAUMANDE, 1981; DRIANCOURT et al., 1985; FIGUEIREDO et al., 1995; RUBIN et al., 2005).

Uma hipótese para explicar esta discrepância seria uma quantidade muito maior de folículos pré-antrais em fêmeas *Bos indicus*. Os trabalhos sobre quantificação de folículos pré-antrais na espécie bovina são anteriores à grande expansão da PIV, situação em que veio à tona a elevada média de oócitos de fêmeas *Bos indicus*. No entanto, os dados da literatura não sinalizam claramente para uma quantidade muito maior às descrições anteriores, obtidas com *Bos taurus* (LUCCI et al., 2002).

A possibilidade de uma fase prolongada de multiplicação das oogônias em fêmeas *Bos indicus* também poderia ser considerada para explicar a diferença na produção de oócitos entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Outra hipótese para justificar a alta quantidade de oócitos obtidos a partir de fêmeas *Bos indicus* seria uma menor taxa de atresia folicular em *Bos indicus* em relação a *Bos taurus*. Finalmente, poderia ser aventada a renovação das células germinativas na fase adulta (JOHNSON et al., 2004; 2005), embora as severas críticas a esta nova hipótese (EGGAN et al., 2006; LIU et al., 2007).

Além do debate sobre a neo-foliculogênese, outro tema tem despertado grande interesse na revisão de conceitos clássicos da foliculogênese: trata-se da epigenética, campo da ciência em grande expansão e recentemente abordado na foliculogênese (SENEDA et al., 2008).

Estes novos conceitos no campo da fisiologia ovariana se mostram bastante pertinentes, pois no campo aplicado à diferença na produção de oócitos entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* tem despertado a atenção dos grupos de pesquisa, graças aos aspectos bastante definidos da produção de oócitos conforme o grau de sangue *indicus* de uma fêmea.

Considerando estes aspectos citados, o objetivo central deste trabalho consistiu em relatar os novos conceitos em foliculogênese, comparar a população de folículos ovarianos pré-antrais e a produção de oócitos de fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*.

2 HIPÓTESE

A maior produção de oócitos de fêmeas *Bos taurus indicus* origina-se de um maior número de folículos pré-antrais, estabelecidos no período fetal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a população folicular ovariana pré-antral e a produção de oócitos em fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Rever conceitos clássicos e apresentar hipóteses inéditas em foliculogênese;
- Comparar a produção de complexo *cumulus* oócito obtidos *in vivo* entre fêmeas *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e produtos do cruzamento *taurus* e *indicus*;
- Comparar a população de folículos ovarianos primordiais, primários e secundários em fetos e novilhas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, por histologia clássica.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O OVÁRIO MAMÍFERO

4.1.1 Aspectos Morfológicos e Estruturais do Ovário

O ovário é composto por uma região cortical e uma medular, sendo circundado por um epitélio superficial conhecido como epitélio germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Logo abaixo, observa-se a túnica albugínea e o estroma ovariano (MURDOCH, 1996). O ovário mamífero é um órgão complexo composto de vários tipos celulares: oócitos, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana. Estes tipos celulares, presentes na região cortical do ovário, posteriormente se diferenciam em vários subtipos. Por exemplo, as células da granulosa diferenciam-se em células do cúmulus, murais ou luteais, enquanto que as células da teca desenvolvem-se em camadas internas e externas (ERICKSON; SHIMASAKI, 2003).

A região cortical é composta por colágenos dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (HAFEZ, 1995). Em animais que estão ciclando, são encontrados no córtex ovariano folículos ovarianos quiescentes, em desenvolvimento ou atresia, corpos lúteos, corpos álbicans e corpos hemorrágicos (MURDOCH, 1996).

A região medular, localizada na porção mais interna do ovário, é constituída por tecido conjuntivo fibroblástico (fibroblastos, fibronectina e fibras colágenas do tipo I e III), nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. É responsável pela nutrição e sustentação do ovário (HAFEZ, 1995).

O ovário desempenha duas importantes funções, uma exócrina ou gametogênica (produção e liberação de óvulos) e uma endócrina ou esteroidogênica (produção e liberação de hormônios esteróides e de peptídeos; HAFEZ, 1995). Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para o sucesso da reprodução (PINEDA, 1989).

A forma do ovário varia de acordo com a espécie e o estágio do ciclo estral (PINEDA, 1989; NUNEZ, 1993; HAFEZ, 1995). Em bovinos, o ovário tem forma de amêndoa e o peso do ovário de vacas adultas varia de 10 a 20 g. O comprimento varia de 3,0 a 4,5 cm, e a largura e a “profundidade”, 1,5 a 2,0 cm e 2,0 a 2,8 cm, respectivamente (HAFEZ,

1995). O peso do ovário de vacas *Bos indicus* e o total de oócitos presentes apresentam correlação muito baixa ($r=0,40$; $p<0,01$; Fernandes et al., 2001).

4.1.2 População Folicular Ovariana

Além da variação individual, vários fatores como espécie, raça (CAHILL et al., 1979), genética (ERICKSON, 1966; Smith et al., 1994), idade, níveis hormonais (PETERS, 1976; RÜSSE, 1983; ROY; TREACY, 1993) e estado reprodutivo do animal (ERICKSON et al., 1976) podem influenciar a população e distribuição dos folículos ovarianos. Estima-se que a população folicular ovariana ao nascimento seja de aproximadamente 235.000 folículos na vaca, podendo variar de 0 a 720.000 folículos por ovário (BETTERIDGE et al., 1989). Em outras espécies, foram encontrados aproximadamente 160.000 folículos pré-antrais na ovelha (DRIANCOURT et al., 1991), e 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986).

4.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

Nas espécies domésticas, as fêmeas nascem com um estoque de oócitos, formado ainda no decorrer da vida fetal, como consequência de dois processos: a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991). Em ruminantes, a oogênese pode ser definida como o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea, culminado com a formação do oócito haplóide fecundado (RÜSSE, 1983). A foliculogênese é um processo fisiológico que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo de *De Graaf* ou pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981).

O término da foliculogênese ocorre no momento da ovulação do folículo maduro, enquanto a oogênese se encerra somente após a fecundação (FIGUEIREDO et al., 2002).

Durante o desenvolvimento fetal, as células germinativas primordiais migram do saco vitelínico para as cristas gonadais, sofrem sucessivas mitoses originando as oogônias. Nesta etapa, células somáticas do mesonefron circundam as oogônias, formando os cordões corticais, precursores dos folículos primordiais (Figura 1). As oogônias sofrem sucessivas mitoses e diferenciam-se em oócitos, que iniciam o processo de divisão

meiótica, o qual é interrompido em prófase da meiose I no estágio de diplóteno (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

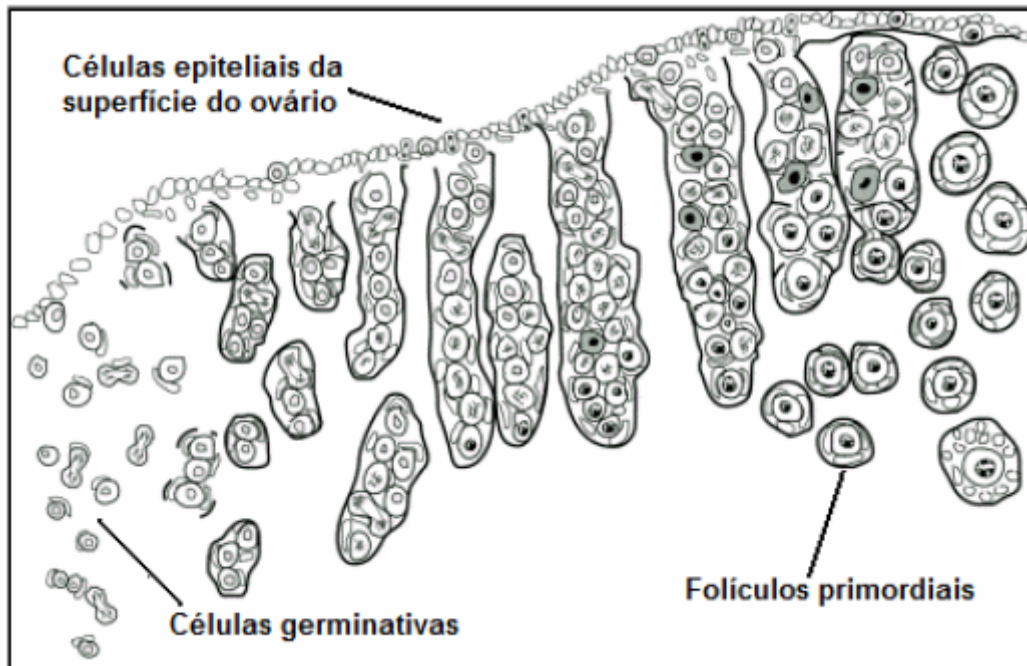


Figura 1 – Esquema ilustrando a origem das células da pré-granulosa durante a formação dos folículos primordiais.

Fonte: adaptado de Juengel et al. (2002)

Em fêmeas bovinas, o oócito primário ou imaturo permanece no estágio de prófase I até imediatamente antes da ovulação. O processo de meiose é retomado em resposta à estimulação pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH; BUCCIONE et al.,1990), passando em seguida pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, ocorrendo a liberação do 1º corpúsculo polar e formação do oócito secundário (BETTERIDGE et al.,1989). O processo de maturação meiótica, *in vivo*, pode ocorrer apenas no oócito do folículo pré-ovulatório dominante e resulta, dentre outros fatores, da estimulação específica pelo pico pré-ovulatório de LH e FSH (ERICKSON, 1986).

No estágio de metáfase II, ocorre uma segunda interrupção da meiose (BETTERIDGE et al.,1989). Na maioria das espécies domésticas, o oócito permanece em metáfase II até ser ovulado e transportado para o oviduto, onde poderá vir a ser fecundado. Caso a fecundação ocorra, o oócito retoma a meiose (BETTERIDGE et al.,1989; BUCCIONE et al.,1990) e culmina com a extrusão do segundo corpúsculo polar (GORDON, 1994), marcando assim o fim da oogênese.

4.3 FOLÍCULOS OVARIANOS

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais). O folículo apresenta funções endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos) e exócrina ou gametogênica, apresentando-se como elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária. Dessa forma, o folículo proporciona um ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito imaturo e permite que oócito maduro alcance a ovulação (FIGUEIREDO et al., 2002).

A população de folículos ovarianos localiza-se no córtex ovariano. Os folículos são classificados em pré-antrais ou não cavitários (primordiais, em transição, primários e secundários) e folículos antrais ou cavitários (terciários e pré-ovulatórios; Figura 2).

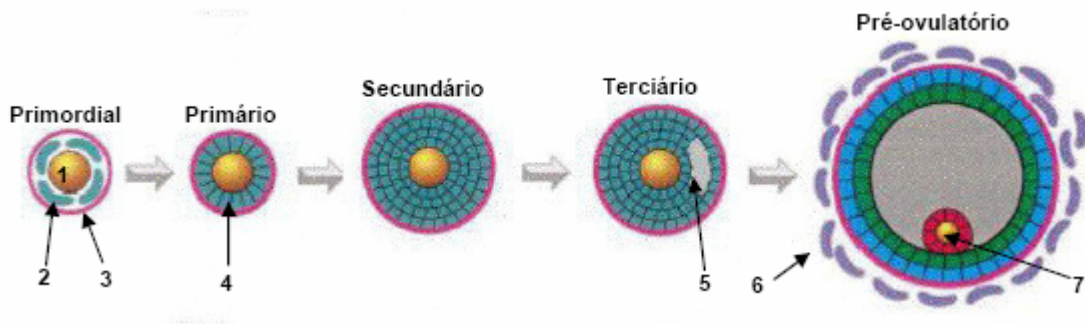


Figura 2 – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Adaptado de Rodgers et al., 1999). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário.

Admite-se, para a fase inicial do crescimento folicular, uma ação predominantemente local e vários fatores de crescimento foram identificados nas primeiras modificações foliculares. Dentre os mais estudados, encontram-se o *Kit Ligand* (PARROT; SKINNER, 1999), GDF-9 (VITT et al., 2000), bFGF (NILSSON et al., 2001) e LIF (NILSSON et al., 2002).

De acordo com o grau de evolução folicular, a população ovariana divide-se em folículos pré-antrais ou não cavitários (folículos primordiais, primários e secundários) e antrais ou cavitários (folículos terciários e pré-ovulatórios). Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representam 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e são responsáveis pela renovação contínua de folículos antrais no ovário (GUILBAULT et al.,

1986). No entanto, aproximadamente 99,9% dos folículos pré-antrais presentes nos ovários não chegam até a ovulação (CARROL et al., 1990), sofrendo um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia. Por isso, o ovário pode ser considerado um órgão de baixíssima produtividade (IRELAND, 1987).

Moustafa e Hafez (1971) afirmaram que aos cinco meses de gestação somente folículos primordiais são observados nos ovários de bovinos e Erickson (1966) relataram que ao redor de 250 dias de gestação aparecem os primeiros folículos antrais. Entretanto, Monteiro et al. (2003) verificaram folículos primordiais, primários, em crescimento e antrais nos ovários de fetos bovinos a partir de 22 semanas de gestação.

4.3.1 Classificação e Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Pré-antrais

Os folículos ovarianos pré-antrais são diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células que circundam o oócito imaturo (FIGUEIREDO et al., 2002). Hulshof et al. (1994) classificaram os folículos pré-antrais em primordiais, primários e secundários, estabelecendo que os folículos primordiais e primários não poderiam ser distinguidos pelo diâmetro, mas sim, por diferenças morfológicas. Segundo este estudo, os folículos primordiais apresentavam um oócito rodeado por uma camada de 4 a 8 células da granulosa achatadas, os primários mostravam um oócito rodeado por uma camada de 11 a 12 células da granulosa cuboidais e os secundários, mais de uma camada de células da granulosa cuboidais.

Os folículos pré-antrais podem ser classificados também de acordo com o grau de viabilidade em folículos saudáveis (com lâmina basal intacta, oócito com não mais de três vacúolos citoplasmáticos, vesícula germinativa e nucléolos intactos), folículos em atresia inicial (estágio I: oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e início de descondensação da cromatina), folículos em atresia moderada (estágio II: oócito com nucléolo e citoplasma em fragmentação e alta condensação da cromatina) ou folículos com atresia acentuada (estágio III: oócito completamente fragmentado ou ausente; BUTLER, 1970; WANDJI et al., 1996).

4.3.1.1 Folículos Primordiais

Na espécie bovina, em torno de 130 dias de gestação, uma camada de células somáticas planas ou achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, circundam o oócito primário ou imaturo (em prófase I), formando o primeiro e mais primitivo dos estádios foliculares, o folículo primordial. Após sua formação, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e o folículo primordial entra no período de dormência ou quiescência. A proliferação celular é retomada somente quando o folículo primordial (quiescente) começa a crescer, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991).

Os folículos primordiais possuem 30-40 μm de diâmetro. No folículo primordial, o oócito possui 20-25 μm de diâmetro (BECKERS et al., 1996) e o núcleo do oócito ocupa uma posição central com nucléolo evidente. As organelas são uniformemente distribuídas no citoplasma ou bem próximas ao núcleo. A mitocôndria é a organela mais evidente e é predominantemente arredondada. O retículo endoplasmático liso e o Complexo de Golgi são pouco desenvolvidos e várias vesículas estão espalhadas pelo citoplasma (LUCCI et al., 2001).

A grande maioria dos oócitos no ovário é armazenada nos folículos primordiais. Os mecanismos envolvidos no recrutamento e na ativação desses folículos ainda não são bem estabelecidos. Presume-se que em 100 dias o folículo primordial bovino atinja o estágio pré-ovulatório (BRITT, 1991).

4.3.1.2 Folículos Primários

Uma vez recrutado, o folículo primordial evolui para folículo primário, cujas células granulosas apresentam formato cubóide (Hulshof et al., 1994), presentes em maior quantidade e mais volumosas (Van Der HURK et al., 1997). Em bovinos, o folículo e o oócito nele contido medem, respectivamente, 40-60 μm e 30- 40 μm de diâmetro (BECKERS et al., 1996). Nessa espécie, essas mudanças morfológicas não podem ser usadas para definir a ativação do folículo quiescente porque os folículos primordiais contêm algumas células da granulosa de forma cubóide na sua estrutura celular (Van WEZEL et al., 1996). Nessa fase, há o surgimento da zona pelúcida, estrutura ao redor do oócito mantida por todo o desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2002).

Assim como nos folículos primordiais, o citoplasma dos oócitos dos folículos primários também contém numerosas mitocôndrias arredondadas. Com o

desenvolvimento do folículo, a mitocôndria torna-se alongada (LUCCI et al., 2001).

4.3.1.3 Folículos Secundários

Com o aumento do oócito, a caracterização da zona pelúcida, as primeiras células da teca (Van Der HURK et al., 1997) e pelo menos duas camadas da granulosa, o folículo secundário encontra-se constituído (HULSHOF et al., 1994). O folículo secundário atinge 60-200 μm de diâmetro em vacas (FIGUEIREDO et al., 2002).

No folículo secundário, o núcleo do oócito passa de uma posição central no oolema dos folículos primordiais para uma região excêntrica, situando-se na região entre a zona pelúcida e o centro do oócito. As organelas também se movem e ficam mais próximas à periferia (HYTTEL et al., 1997). O retículo endoplasmático liso aumenta de tamanho e a grande maioria das mitocôndrias são alongadas (LUCCI et al., 2001).

Nos folículos secundários e estágios subseqüentes, a comunicação entre as células da granulosa e o oócito é feita por junções intercomunicantes (*GAP junctions*; HYTTEL et al., 1997).

4.3.2 Caracterização Estrutural e Ultraestrutural dos Folículos Antrais

A categoria de folículos antrais compreende os folículos terciários e os folículos *De Graaf* ou também conhecidos como maduros, pré-ovulatórios ou dominantes. Com a intensa proliferação das células da granulosa, há o surgimento do antro folicular, uma área preenchida por fluido folicular, característica do folículo antral (FIGUEIREDO et al., 2002). O surgimento dos primeiros folículos terciários em vacas é observado aos 230 dias de gestação (ERICKSON, 1966; RÜSSE, 1983).

Em bovinos, a cavidade antral pode se desenvolver em folículos cujos diâmetros variam de 0,14-0,28 mm (LUSSIER et al., 1987). Os folículos crescem em tamanho e o diâmetro dos folículos primordiais aumenta de 0,020-0,040 mm (bovinos) para mais de 10 mm antes da ovulação (IRELAND, 1987). São necessários 2 ciclos estrais para um folículo crescer do início da formação do antro (0,13 mm) ao tamanho pré-ovulatório (LUSSIER et al., 1987).

Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, uma

membrana basal e duas camadas de células tecais (teca interna e teca externa; Gordon, 1994). Caracterizam-se pela presença de numerosas microvilosidades dentro da zona pelúcida, bem como de numerosas partículas lipídicas e mitocôndrias arredondadas e alongadas. Um maior número de complexos de Golgi pode ser observado e os grânulos da cortical estão distribuídos no ooplasma, podendo-se evidenciar ainda os microtúbulos (FAIR et al., 1997).

Os folículos de *De Graaf* representam o estágio terminal do desenvolvimento folicular. Neles predominam mitocôndrias arredondadas, mas mitocôndrias encapuzadas, que caracterizam o completo crescimento do oócito em bovinos, também são comumente encontradas. Retículo endoplasmático liso e rugoso são observados em grande quantidade. Podem ser identificados ainda grânulos da cortical e microtúbulos no ooplasma do oócito. O espaço perivitelino é formado neste estágio de desenvolvimento e há um aumento no número de vesículas e de complexos de Golgi. É também no final deste estágio que a função do nucléolo é inativada, como indica a marginalização dos centros fibrilares, sinalizando uma presumível retração dos genes rRNA do nucléolo. Concomitantemente, a atividade transcricional do oócito é diminuída. Foi demonstrado, entretanto, que a transcrição de mRNA não é completamente inativada com o crescimento total do oócito (HYTTEL et al., 1997).

4.4 ATRESIA FOLICULAR

Como mencionado anteriormente, aproximadamente 99,9% dos folículos pré-antrais presentes nos ovários não chegam até a ovulação, sofrendo um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia. A atresia folicular não é igualmente prevalente em todos os estádios de desenvolvimento folicular (FORTUNE, 1994). A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, que parece ser um dos elementos que controla o número de folículos selecionados até chegar à ovulação. A duração precisa, bem como o estágio no qual os folículos ovarianos são mais susceptíveis de sofrer atresia, não são conhecidos (HENDERSON et al., 1987).

O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos nesta fase de desenvolvimento (MORITA; TILLY, 1999). Em folículos pré-antrais, alterações nas células da granulosa são raramente observadas

(JORIO et al., 1991). É importante ressaltar que após a formação da cavidade antral, ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa. O aparecimento de células da granulosa com núcleos picnóticos, onde se observa condensação da cromatina e retração nuclear, podem ser considerados como os primeiros sinais morfológicos de atresia, que são observados predominantemente em células da granulosa em proximidade da cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral (HUGHES; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). Com a progressão da atresia, observa-se redução no número de camadas das células da granulosa e invasão do folículo por fibroblastos e macrófagos. Após estas drásticas mudanças na camada granulosa o oócito, frequentemente, sofre pseudomaturação, fragmenta-se e, finalmente, é eliminado durante os estágios finais de atresia (BYSKOV, 1974).

Apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo, conseqüentemente, a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (FIGUEIREDO et al., 2002).

4.5 RENOVAÇÃO FOLICULAR

Apesar do conceito do estoque finito e não renovável de células germinativas (ZUCKERMAN, 1951) ser amplamente aceito, Johnson et al. (2004 e 2005) surpreenderam a comunidade científica ao demonstrarem indícios de continuidade da oogênese e foliculogênese no período pós-natal, apontando as células-tronco da medula óssea como responsáveis pela renovação dos gametas femininos.

Os trabalhos de Johnson et al. (2004 e 2005) geraram muita controvérsia no meio científico. Um dos aspectos refere-se à ocorrência da menopausa e a inatividade ovariana em fêmeas senis. As críticas também estão relacionadas à ausência de sinais de início e término da primeira prófase meiótica e subseqüente fase de diplóteno nos supostos oócitos derivados de células-tronco. Além disso, o curto período para crescimento dos novos folículos permitiu o questionamento da eficácia da esterilização química.

A teoria de neo-oogênese/foliculogênese proposta por Johnson et al. (2004 e 2005) é polêmica e desafia um conceito de mais de 100 anos. Apesar da questão permanecer em discussão, os trabalhos sugerem uma revisão dos conceitos sobre foliculogênese.

4.6 FISILOGIA REPRODUTIVA DE FÊMEAS TAURINAS E ZEBUÍNAS

Existem diferenças na fisiologia reprodutiva entre *Bos taurus taurus* (*Bos taurus*) e *Bos taurus indicus* (*Bos indicus*) que devem ser consideradas, pois implicam em diferentes técnicas de manejo e respostas a tratamentos hormonais. O conhecimento dessas particularidades é fundamental para aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2007).

Com relação ao estro comportamental, existem diferenças observadas entre raças (RAE et al., 1999), e embora ainda não completamente elucidadas, entre grupos genéticos (zebuínos e taurinos). Fêmeas *Bos indicus* geralmente apresentam estro de duração mais curta (aproximadamente 10 horas), o que dificulta sua detecção (BÓ et al., 2003). Além disso, mais de 50% dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de estro no período noturno (entre 18:00 e 6:00 horas; PINHEIRO et al., 1998; MEMBRIVE, 2000), sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO et al., 1998), dificultando o manejo e a eficácia da detecção de estro. Em condições brasileiras de manejo, a avaliação do comportamento reprodutivo de vacas de corte com auxílio de radiotelemetria (*Heat-Watch*) mostrou que a duração do estro em *Bos indicus* é menor do que em *Bos taurus* ($12,9 \pm 2,9$ horas em Nelore vs. $16,3 \pm 4,8$ horas em Angus; Mizuta, 2003). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não apresentou diferenças entre estas duas raças (Nelore, $27,1 \pm 3,3$ horas vs. Angus, $26,1 \pm 6,3$ horas).

Considerando o número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral, animais da raça Holandesa apresentam predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989; WOLFENSON et al., 2004). Entretanto, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Brahman – RHODES et al., 1995; Nelore – FIGUEIREDO et al., 1997; Gir – VIANA et al., 2000). Além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus* ($33,4 \pm 3,2$ vs $25,4 \pm 2,5$; Carvalho et al., 2008). Essa característica tem influência direta na eficiência da técnica de transferência de embriões e de OPU-PIV,

indicando vantagem de fêmeas zebuínas sobre taurinas. Utilizando-se o método de lavagem uterina, a média de embriões obtidos é similar entre esses grupos genéticos (CASTRO-NETO et al., 2005). No entanto, a média de oócitos recuperados por aspiração folicular é maior para fêmeas zebuínas (média de 18 a 25 oócitos; WATANABE et al., 1999; THIBIER, 2004; RUBIN et al., 2004) do que para taurinas (média de 4 e 14 oócitos

por sessão de aspiração folicular; Machado et al., 2003; Rubin et al., 2005; Martins Jr et al., 2007). Existem relatos de que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferenças entre indivíduos, e essa característica possui alta repetibilidade durante a vida reprodutiva da fêmea (BONI et al., 1997).

Alguns autores levantaram a hipótese de que a possibilidade de um maior número de folículos presentes no ovário de *Bos indicus* poderia ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (BÓ et al., 2003). Essa diferença nas concentrações de FSH e de IGF-I pode explicar a maior sensibilidade ao tratamento superovulatório em doadoras *Bos indicus* (BARROS; NOGUEIRA, 2001). Existem relatos que confirmam que é possível reduzir consideravelmente a dose de FSH para superovular fêmeas Nelore (BARUSELLI et al., 2003), empregando doses inferiores às usualmente utilizadas para *Bos taurus*.

Há diferenças moderadas entre o tamanho do trato reprodutivo e a divergência folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (ADAYEMO; HEATH, 1980; SARTORELLI et al., 2005). Em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*), a divergência tem início por volta do dia 2,8 após a emergência (GINTHER et al., 1996) e, em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), 2,5 a 2,7 dias após a ovulação (GIMENES et al., 2005; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006).

O diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento folicular também difere entre fêmeas *Bos taurus* (17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda; GINTHER et al., 1989) e *Bos indicus* (11,3 e 12,1 mm, respectivamente; FIGUEIREDO et al., 1997). Para animais com três ondas de crescimento folicular, os diâmetros máximos foram de 16,0; 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus* (GINTHER et al., 1989) e 10,4; 9,4 e 11,6 mm para *Bos indicus* (FIGUEIREDO et al., 1997). O diâmetro do corpo lúteo também parece ser menor em *Bos indicus* (17 a 21 mm de diâmetro; RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997) do que em *Bos taurus* (20 a 30 mm de diâmetro; GINTHER et al., 1989; KASTELIC et al., 1990). Da mesma maneira, há relatos de que a concentração de progesterona produzida pelo CL também é inferior em zebuínos em relação aos taurinos (SEGERSON et al., 1984).

REFERÊNCIAS

- ADAYEMO, O., HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.14, p.422-420, 1980.
- BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., REIS, E.L., NASSER, L.F.T., SILVA, R.C.P., MENEGATTI, J.A., VALENTIN, R., SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folotropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.244-245, 2003.
- BARUSELLI, P.S., GIMENES, L.U., SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.205- 211, 2007.
- BECKERS, J.F., DRION, P.V., FIGUEIREDO, J.R., GOFFIN, L., PIROTTIN, D., ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.543-548, 1996.
- BETTERIDGE, K.J., SMITH, C., STUBBINGS, R.B., XU, K.P., KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.
- BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.
- BONI, R., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C., KOGUT, J., KRUIP THAM. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.
- BRITT, J.H. Impacts of early postpartum metabolism of follicular development and fertility. **Bovine Practice**, v.24, p.39-43, 1991.
- BUCCIONE, R., SCHROEDER, A.C., EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.
- BUTLER, H.W. Ultrastructural studies on mitochondrial swelling. **Journal of Biochemistry**, v.118, p.883-886, 1970.
- BYSKOV, A.G.S. Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.37, p.277-285, 1974.

CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.27-36, 1979.

CARROL, J., WHITTINGHAM, D.G., WOOD, M.J., *et al.* Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.321-327, 1990.

CARVALHO, J.B.P., CARVALHO, N.A.T., REIS, E.L., NICHI, M., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-175, 2008.

CASTILHO, C., GARCIA, J.M., RENESTO, A., NOGUEIRA, G.P., BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.189-96, 2006.

CASTRO NETO, A.S., SANCHES, B.V., BINELLI, M., SENEDA, M.M., PERRI, S.H., GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v.63, p.1249-1255, 2005.

DRIANCOURT, M.A., CAHILL, L.P., BINDON, B.M. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.73, p.93-107, 1985.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.

EGGAN, K., JURGA, S., GOSDEN, R., MIN, I.M., WAGERS, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. **Nature**, v.441, p.1109-1114, 2006.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A., MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v.15, p.555- 560, 1976.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproduction Endocrinology**, v.4, p.233-254, 1986.

ERICKSON, G.F., SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.5, p.1-9, 2003.

FAIR, T., HULSHOF, C.J., HYTTEL, P., GREVE, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**, v.195, p.327-336, 1997.

FERNANDES, C.E., DODE, M.A.N., GODOY, K., RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 38, p.131-135, 2001.

FIGUEIREDO, J.R. **Isolement, caractérisation et culture de follicules pré-antraux chez les bovins**. Université de Liège, Belgique, 1995, 113p. Tese de Doutorado. Université de Liège, 1995.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIN, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais – Moifopa. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002. p.340.

FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLE, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F., MADUREIRA, E.H., TRINCA, L.A., BARROS, C.M., BARUSELLI, P.S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl.1, p.210, 2005 (Resumo).

GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.

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

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 1st ed. Cambridge: CAB International: Raven Press, 1994.

GUILBAULT L.A., DUFOURT J.J., THATCHER W.W., DROST M., HAIBEL G.K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.73, p.127-135, 1986.

HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1995. p.573.

HENDERSON, K.M., MC NATTY, K.P., SMITH, P., GIBB, M., O'KEEFFE, L.E., LUN, S., HEATH, D.A., PRISK, M.D. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.333-343, 1987.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International review of cytology**, v.124, p.43-101, 1991.

HUGHES M.H., GOROSPE W.C. Biochemical identification of apoptosis (programed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**, v.129, p.2415-2422, 1991.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16(2), p.78-80, 1994.

HYTTEL, P., FAIR, T., CALLENSSEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

IRELAND J.J. Control of Follicular Growth and Development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.39-54, 1987.

JOHNSON, J., BAGLEY, J., SKAZNIK-WIKIEL, M., LEE, H.J, ADAMS, G.B., NIKURA, Y., TSCHUDY, K.S., TILLY, J.C., CORTES, M.L., EORKERT, R., SPITZER, T., IACOMINI, J., SCADDEN, D.T., TILLY, J.L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral. **Cell**, v.122, p.303-315, 2005.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J.K., TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145- 150, 2004.

JORIO A., MARIANA J.C., LAHLOU-KASSI A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.239-250, 1991.

JUENGEL, J.L., SAWYER, H.R., SMITH, P.R., QUIRKE, L.D., HEATH, D.A., LUN, S., WAKEFIELD, S.J., MCNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p.1-10, 2002.

KASTELIC, J.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v.33, p.1269-1278, 1990.

LIU, Y., WU, C., LYU, Q., YANG, D., ALBERTINI, D.F., KEEFE, D.L., LIU, L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. **Developmental Biology**, 2007 (in press).

LUCCI, C.M., SILVA, R.V., CARVALHO, C.A., FIGUEIREDO, R., BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.41, p.61-69, 2001.

LUCCI, C.M., RUMPF, R., FIGUEIREDO, J.R., BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.57, p.1467–1483, 2002.

LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates follicles in the ovary of the cow. **Reproduction and Fertility**, v.81, p.301-307, 1987.

MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPPERT, M., MATOS, L.F., WOLF, E., GONÇALVES, P.B.D. Variabilidade da punção folicular transvaginal e da produção *in vitro* de embriões em vacas gêmeas monozigóticas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.442-443, 2003 (Resumo).

MARTINS JR., A., TAKADA, L., ABRAHÃO, R.G., FREITAS, C.P., CALEGARI, R.S. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1194-1194, 2007 (Resumo).

MEMBRIVE, C.M.B. **Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetria, em novilhas cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17 β estradiol + progesterona.** São Paulo, 2000. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*).** São Paulo, 2003. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MONTEIRO, C.M.R., CARVALHAL, R., PERRI, S.H.V. Análise morfológica dos ovários de fetos bovinos da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*) em diferentes fases da gestação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.409-415, 2003.

MORITA Y., TILLY J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p.1-17, 1999.

MOUSTAFA, L.A., HAFEZ, E.S. Prenatal development of the bovine reproductive system. **Journal of Reproductive Medicine**, v.7, .3, p.99-113, 1971.

MURDOCH, W.J. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. **Biology Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v.71, p.529-543, 1996.

NASSER, L.F., REZENDE, L.F., BÓ, G.A., BARTH, A. Induction of parturition in Zebu-cross recipients carrying *in vitro*-produced *Bos indicus* embryos. **Theriogenology**, v.69, p.116–123, 2008.

NILSSON, E., PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123-30, 2001.

NILSSON, E., KEZELE, P., SKINNER, M.K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, p.65-73, 2002.

NUNEZ, Q.M. Morfologia del tracto genital de los pequeños ruminantes. **Revista Científica**, v.3, p.77-86, 1993.

PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, n.9, p.4262-71, 1999.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v.16, p.271-278, 1976.

PINEDA, M.H. Female reproductive system. In: MCDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia. 1989. p.303-354.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

PONTES, J.H.F., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B.V., ERENO-JUNIOR, J.C., UVO, S., BARREIROS, T.R.R., OLIVEIRA, J.A., HASLER, J.F., SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, n.4, p.690-697, 2009.

RAE, D.O., CHENOWETH, P.J., GIANGRECO, M.A., DIXON, P.W., BENNET, F.L. Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. **Theriogenology**, v.51, p.1121-1132, 1999.

RHODES, F.M., DE'ATH, G., ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-277, 1995.

RODGERS, R.J., LAVRANOS, T.C., VAN WEZEL, I.L., IRVING-RODGERS, H.F. Development of the ovarian follicular epithelium. **Moleccular and Cellular Endocrinology**, v.151, p.171-179, 1999.

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

RUBIN, K.C.P., RIGO, A.G., SCHROEDER, R.V., SILVA, R.C.P, MARQUES, M.O., SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.121, 2004 (Resumo).

RUBIN, K.C.P., PONTES, J.H.F., NONATO JR., ERENO JR, J.C., PANSARD, H., SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005 (Resumo).

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.

SANTOS, R.G., SOTO, M.A.B., LOURENÇO, R.X., STRANIERI, P., BISHOP, W., ACCORSI, M.F., WATANABE, M.R., DAYAN, A., WATANABE, Y.F. Aspiaração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005. **Anais...**, p.79, 2005 (Resumo).

SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J., BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SAUMANDE J. La Folliculogenèse Chez les Ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.167, p.205-218, 1991.

SAUMANDE J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.157, p.29-38, 1981.

SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.663-671, 1988.

SEGERSON, E.C., HANSEN, T.R., LIBBY, D.W., RANDEL, R.D., GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.59, p.1026-1046, 1984.

SENEDA, M.M., GODMANN, M., MURPHY, B.D., KIMMINS, S., BORDIGNON, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. **Reproduction**, v.135, p.829-838, 2008.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308-317, 1988.

SMITH, P.W.S-O., BRAW-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuses that are homozygous carriers or non-carriers of the FecB gene. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.41-54, 1994.

SOTO-SUAZO, M., ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.3, p.147-160, 2005.

THIBIER, M. New records in the numbers of both *in vivo*-derived and *in vitro*-produced bovine embryos around the world in 2006. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v.25, p.15-20, 2007.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p.12-19, 2004.

TILLY J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.162-172, 1996.

VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

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

VAN WEZEL, I., RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.55, p. 1003-1011, 1996.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501-2509, 2000.

VITT, U.A., MCGEE, E.A., HAYASHI, M., HSUCH, A.J. *In vivo* treatment with GDF9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v.141, p.3814-20, 2000.

WATANABE, M.R., WATANABE, Y.F., FRANCESCHINI, P.H., DAYAN, A., LOBO, R.B. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.438, 1999.

WANDJI, S.A., EPPIG, J.J., FORTUNE, J.E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.817-832, 1996.

WOLFENSON, D., INBARA, G., ROTH, Z., KAIMB, M., BLOCHA, A., BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v.62, p.1042-1055, 2004.

ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in the mature ovary. **Recent Progress in Hormone Research**, v.6, p.63-108, 1951.

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1

“Desafios e perspectivas da foliculogênese”

Submetido à Revista Brasileira de Reprodução Animal em 03 de setembro de 2008.

Desafios e perspectivas da foliculogênese
(*Challenges and prospects of folliculogenesis*)

Marcelo Marcondes *Seneda*^{1,2}, Katia Cristina Fernandes da *Silva*¹

¹Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina,
PR, Brasil, 86051-990

²Correspondência: mseneda@uel.br

Resumo

Novas teorias têm sido propostas sobre a origem e o crescimento dos gametas femininos, desafiando conceitos de mais de 150 anos. A possibilidade de formação contínua de folículos e oócitos apresenta-se como hipótese extremamente interessante, mas requer ainda novos trabalhos, seja para comprovar sua existência ou refutá-la definitivamente. O estudo da epigenética surge como grande possibilidade para uma melhor compreensão dessas teorias. As variações epigenéticas são dinâmicas, transmitidas entre gerações e guardam relação com o ambiente. O estoque finito de oócitos, a renovação contínua, ou a co-existência de ambos são discutidos neste artigo.

Palavras chave: Folículos. Oócitos. Foliculogênese. Epigenética.

Abstract

New theories have been proposed for the origin and growth of female gametes, challenging concepts of more than 150 years. The possibility of continue formation of follicles and oocytes appears to be very interesting hypothesis, but it still need further works, either to prove or refute its existence forever. The study of epigenetic comes as a remarkable possibility for a better understanding of these theories. The epigenetic changes are dynamic, passed down between generations and are related with environment. The finite stock of oocytes, the continuous renewal, or co-existence of both are discussed in this paper.

Keywords: Follicles. Oocytes. Folliculogenesis. Epigenetic.

Introdução

Para uma expansão sólida de todo o universo tecnológico vinculado à reprodução, a base fundamental de toda a fisiologia feminina é a foliculogênese. Por esta razão, o interesse sobre o tema tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. As crescentes aplicações, bem como os múltiplos desafios das biotécnicas de colheita e transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões e inseminação artificial em tempo fixo, além de técnicas associadas, como a medicina regenerativa, por exemplo, justificam a necessidade do contínuo aprimoramento do conhecimento da fisiologia das fêmeas, envolvendo oogênese, foliculogênese e desenvolvimento embrionário.

Um dos aspectos mais surpreendentes da foliculogênese é a produção de oócitos obtida naturalmente a partir de fêmeas Nelore. Vacas Nelore produzem, em média, 25 oócitos por sessão de aspiração folicular, sem qualquer procedimento adicional, como aplicação de FSH, BST ou controle do ciclo estral. Esta média de oócitos por sessão é aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida de vacas de raças européias. Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas capazes de produzir centenas de oócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de 251 (SENEDA et al., dados não publicados) e até 564 oócitos obtidos em um único procedimento (SANTOS et al., 2005). Considerando a possibilidade de três ondas de crescimento folicular, seria possível a projeção de mais de 1000 folículos recrutados em apenas um ciclo estral.

As biotécnicas associadas à reprodução têm apresentado um crescimento extraordinário nos últimos anos, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos aplicados. O Brasil apresenta-se como segundo país em embriões bovinos produzidos *in vivo* e líder mundial dos produzidos *in vitro*, e isto certamente tem correlação com o predomínio da raça Nelore no plantel nacional. Para fêmeas Nelore, pode-se admitir uma maior quantidade de embriões por procedimento com a produção *in vitro* de embriões (PIVE), quando comparada à colheita e transferência de embriões (NONATO Jr et al., 2004).

Igualmente em franco desenvolvimento encontra-se a epigenética, a área do conhecimento que estuda as interações dinâmicas do DNA com as proteínas e grupos químicos presentes no núcleo da célula. Embora as possibilidades de variação da expressão gênica sejam conhecidas há alguns anos, apenas em

passado bastante recente as interações epigenéticas passaram a ser melhor compreendidas. Um grande incremento ao estudo da epigenética adveio com a surpreendente descoberta do limitado número de genes da espécie humana. O Projeto Genoma Humano demonstrou de maneira inequívoca a necessidade de se buscar outras explicações, além da quantidade de genes, para justificar a complexidade funcional dos organismos superiores.

Apesar das áreas citadas serem de extrema importância para o progresso da ciência e para a herança genética das futuras gerações, o controle epigenético da reprodução é relativamente pouco conhecido. No contexto da reprodução, vários aspectos do conhecimento fisiológico, da eficiência de produção e da aplicabilidade do modelo animal nas ciências biomédicas, seriam extremamente beneficiados com um maior conhecimento da epigenética.

Somando-se aos aspectos dinâmicos da aplicação de tais biotécnicas, o estudo da foliculogênese apresenta-se em momento extremamente importante. No contexto do estabelecimento da população folicular ovariana, novas teorias têm sido propostas, desafiando conceitos de mais de 150 anos sobre a origem e o crescimento dos gametas femininos. A neo-foliculogênese apresenta-se como hipótese a requerer profundos e sólidos trabalhos, seja para comprovar sua existência ou refutá-la definitivamente. O estoque finito de oócitos, a renovação contínua, ou a co-existência de ambos são discutidos neste artigo.

Conceitos básicos da foliculogênese

Admite-se que o início da foliculogênese em fêmeas mamíferas ocorre na fase fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a gônada em formação, originando as oogônias. Estas diferenciam-se em oócitos, os quais, associados com as células da pré-granulosa, constituem os folículos primordiais. Os oócitos iniciam o processo de divisão meiótica, o qual é interrompido em prófase da meiose I até o recrutamento folicular (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005; Van Den HURK; ZHAO, 2005). Somente após o recrutamento há continuidade do desenvolvimento do folículo e retomada da meiose, no estágio final de desenvolvimento do folículo antral (Eppig et al., 1992). Apesar da importância do

recrutamento folicular para o entendimento da foliculogênese, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda permanecem desconhecidos.

Uma vez recrutado, o folículo primordial passa a folículo primário, cujas células granulosas apresentam formato cubóide. Uma característica marcante dessa fase é o surgimento da zona pelúcida, estrutura ao redor do oócito mantida por todo o desenvolvimento folicular.

Com o aumento do oócito, a caracterização da zona pelúcida, as primeiras células da teca e pelo menos duas camadas da granulosa, o folículo secundário encontra-se constituído, e já são verificados os efeitos do FSH e LH (Van Den HURK et al., 2000).

A etapa seguinte do desenvolvimento consiste no folículo terciário, cuja distinção do anterior ocorre pela multiplicação das camadas da granulosa, além da organização completa das células da teca. O FSH tem se revelado como agente fundamental nesta etapa. Não apenas pela sua ação endócrina conhecida, mas também pelo seu envolvimento na ação parácrina de fatores de crescimento, como relatado para membros do grupo FGF, como o FGF-8 (BURATINI et al., 2005). Um grande evento fisiológico, a formação do antro, representa um marco importante no estudo do crescimento folicular, pois é precursor dos processos de desvio e dominância folicular.

Além de representar a fase de mais intensa ação gonadotrófica, a presença do líquido folicular viabiliza os estudos ultra-sonográficos, permitindo o acompanhamento *in vivo* até o destino final do folículo: atresia ou ovulação. A repetição destes processos ao longo da vida pós-natal leva ao declínio progressivo do número de oócitos, sendo aceita a ausência de células germinativas nos ovários na senilidade (WALDEYER, 1870).

Novos conceitos em foliculogênese

Apesar do conceito sobre o estoque finito e não renovável de células germinativas ser considerado uma premissa básica da fisiologia da reprodução há mais de 150 anos (Byskov et al., 2005), Johnson et al. (2004 e 2005) apresentaram evidências para propor a revisão deste paradigma, demonstrando indícios da

continuidade da oogênese e foliculogênese no período pós-natal, pela atuação de células-tronco.

Existem várias populações de células-tronco na medula óssea, com evidências promissoras de potencial de plasticidade, isto é, habilidade de gerar células de outros tecidos, independente do folheto embrionário de origem. Este potencial de plasticidade da célula-tronco parece favorecer a hipótese de neo-oogênese/foliculogênese formulada por Johnson et al. em 2004. Esses autores demonstraram a ocorrência de proteínas específicas do início da meiose em ovários de camundongas adultas, o que somente deveria ocorrer durante a fase fetal, de acordo com o conceito atual. Em 2005, Johnson et al. submeteram um grupo de camundongas à esterilização química, relatando ausência de folículos após o tratamento. Em seguida, os animais receberam transfusão de medula óssea e sangue periférico e, uma semana após, folículos viáveis em crescimento foram identificados nos ovários.

A hipótese de Johnson et al. (2004 e 2005) tem promovido acirrados debates, sendo contrariada por outros pesquisadores. Nos aspectos clínicos, a ocorrência da menopausa e a inatividade ovariana em fêmeas senis apresentam-se como fenômenos amplamente aceitos. Outras críticas referem-se à ausência de sinais de início e término da primeira prófase meiótica e subsequente fase de diplóteno nos supostos oócitos derivados de células-tronco. Além disso, o curto período para crescimento dos novos folículos permitiu o questionamento da eficácia da esterilização química.

Em um experimento especificamente delineado para aferir a hipótese de Johnson et al. (2004; 2005), Eggan et al. (2006) pesquisaram a renovação folicular por células difundidas pelo sangue em camundongas parabióticas, animais isogênicos unidos cirurgicamente pela lateral do corpo, para uma circulação sanguínea partilhada. Sendo uma das fêmeas transgênica para uma proteína fluorescente, esperava-se a expressão desta proteína nos oócitos da outra fêmea, não transgênica. No entanto, mesmo após 6 meses testando diversos ensaios experimentais nas camundongas parabióticas, os autores não obtiveram ovulação de nenhum oócito expressando a proteína fluorescente, contrariando a teoria apresentada por Johnson et al. (2004 e 2005).

Apesar da conclusão de Eggan et al. (2006) mencionada acima, alguns detalhes comparativos entre os trabalhos merecem atenção. Enquanto o grupo

liderado por Tilly (JOHNSON et al. 2004 e 2005) descrevem a “renovação folicular”, Eggen et al. (2006) declaram a ausência de “oócitos ovulados”. Ou seja, permanece uma lacuna, referente ao intervalo existente entre a formação e crescimento de um folículo – aspectos inicial e intermediário – e a presença de um oócito maduro no oviduto – produto final.

Apesar das oposições à teoria de renovação folicular pós-natal, outros grupos, utilizando diferentes estratégias experimentais, realizaram descobertas bastante promissoras, indiretamente em favor da mesma. Após a indução de diferenciação de uma cultura de células-tronco de epiderme de fetos suínos, Dyce et al. (2006) verificaram que algumas dessas células apresentaram marcadores típicos de células germinativas em formação. Posteriormente, foram identificadas estruturas semelhantes a folículos em crescimento, capazes de produzir estrógeno, progesterona e responsivas a estímulos de FSH e LH. Além disso, os autores relataram partenogênese espontânea, com formação de estruturas semelhantes a embriões. Apesar de já haver relato na literatura de diferenciação *in vitro* espontânea de células-tronco em células germinativas a partir de cultivo de células embrionárias humanas (CLARK et al., 2004), até o momento, nenhum outro grupo alcançou o feito de produção de oócitos, folículos (secretando esteróides) e embriões – embora partenogênicos – a partir de células-tronco, como descrito pela equipe de Guelph (DYCE et al., 2006).

Mais recentemente, Liu et al. (2007) utilizaram ovários de mulheres adultas obtidos cirurgicamente por razões extra-ovarianas, como anomalias uterinas. Através de técnicas de RT-PCR, *Western Blot* e imunohistoquímica, os autores pesquisaram a expressão de alguns dos principais genes envolvidos com a meiose (SCP3, Oct3, Oct4, c-KIT, PCNA e KI-67), concluindo não haver indícios da ocorrência de meiose, contrariando dessa forma a hipótese de renovação folicular pós-natal.

Tilly e Johnson (2007) prontamente contra-argumentaram a conclusão de Liu et al. (2007), alegando ser a “ausência da evidência” argumento científico insuficiente para refutar a nova hipótese. Segundo os pesquisadores de Harvard, para refutar a nova hipótese, experimentos mais sólidos do que ausência de expressão gênica seriam necessários, especialmente após transcorridos quatro anos desde o primeiro artigo apresentando a neo-foliculogênese (JOHNSON et al., 2004).

A partir dos trabalhos de Johnson et al. (2004 e 2005), sugerindo a participação de células-tronco provenientes da medula óssea na neo-oogênese/foliculogênese, algumas especulações podem ser feitas. Seria possível ocorrer alguma alteração folicular ou ovariana após auto-transferência de medula óssea ou retirada da mesma e reinjeção no mesmo organismo? Quando submetidas a um estímulo, camundongas jovens que sofreram esterilização química apresentariam resposta diferente de camundongas que tiveram esgotamento natural de suas reservas foliculares?

Seguindo esse raciocínio, seria a esterilização química um agente para a neofoliculogênese? Sabe-se que mulheres jovens que sofreram esterilização química, quando submetidas a um estímulo, voltaram a produzir folículos.

A teoria da neo-oogênese/foliculogênese é polêmica, afinal, trata-se de um questionamento sobre um conceito amplamente aceito por mais de 150 anos. Os trabalhos atualmente em andamento deverão contribuir para esclarecer melhor a questão.

Epigenética e foliculogênese

A “epigenética” estuda as modificações fenotípicas herdáveis sem alterações na seqüência do DNA, ou seja, informações carregadas pelo código genético não vinculadas ao DNA (COSGROVE; WOLBERGER, 2005).

Nos eucariotos, a informação genética é armazenada na cromatina, um polímero composto pela associação do DNA com 4 proteínas histonas - H2A, H2B, H3 e H4- mais uma histona de conexão- H1 (TROTTER; ARCHER, 2007). O conjunto de 147 pares de base do DNA arranjadas ao redor de um octâmero de proteínas histonas constitui o nucleosomo (Fig. 1).

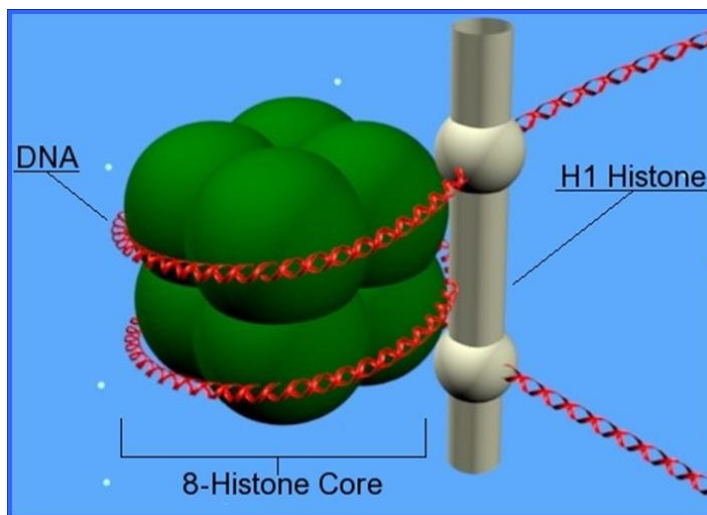


Figura 1. Estrutura esquemática do nucleossomo. DNA (vermelho) envolto no octâmero (verde) de histonas H2A, H2B, H3 e H4. H1: histona de conexão.

Por muito tempo, acreditou-se que o nucleossomo tivesse função apenas estrutural, permitindo a condensação e organização do DNA no núcleo da célula (COSGROVE; WOLBERGER, 2005).

Recentemente, descobriu-se o papel crucial e dinâmico do nucleossomo no controle da expressão gênica. Conforme a maior ou menor interação do DNA com as proteínas que compõem o nucleossomo, a expressão dos genes pode ser alterada. Em outras palavras, o controle transcricional depende da acessibilidade do DNA, sendo este aspecto regulado por modificações nas histonas (NARLIKAR et al, 2002). Essas modificações bioquímicas podem ocorrer por fatores endógenos ou exógenos, sendo normalmente de natureza reversível. As principais alterações bioquímicas, como metilação, fosforilação e acetilação, são capazes de interferir na interação do DNA com as histonas, causando modificações na capacidade de expressão do código genético. Essas reações são predominantemente reversíveis, constituindo assim uma maneira muito dinâmica de facilitar ou reprimir a ação do DNA (MELLOR, 2006).

Os processos epigenéticos são naturais e essenciais para muitas funções do organismo, porém se ocorrerem inadequadamente podem ter efeitos adversos na saúde e no comportamento. Agentes como metais pesados, pesticidas, hormônios, vírus, bactérias entre outros podem gerar alterações bioquímicas na cromatina, interferindo na expressão de certos genes, podendo levar a disfunções respiratórias, reprodutivas e a vários tipos de câncer. Essas modificações epigenéticas podem ser

transmitidas por até quatro gerações, evidenciando assim a importância da epigenética no processo evolutivo (WEINHOLD, 2006).

Diversos fatores, internos e externos, são capazes de atuar nas modificações no nucleosomo e assim interferir na expressão final do código genético (KIMMINS; SASSONE-CORSI, 2005). Portanto, a epigenética poderia ser considerada uma ponte entre o genótipo e o fenótipo (GOLDBERG et al., 2007), apresentando-se como um mecanismo essencial para o processo evolutivo, já que estímulos externos podem variar a expressão do genoma. Tais aspectos apresentam acréscimo de importância para as células germinativas, considerando a propagação de informações para as próximas gerações (KIMMINS; SASSONE-CORSI, 2005).

A ativação ou repressão da transcrição também está relacionada com a ação de remodeladores da cromatina. Os remodeladores são complexos protéicos que alteram a mobilidade do nucleosomo, permitindo uma espécie de “deslizamento” entre as proteínas histonas e a dupla hélice do DNA. Com essa movimentação, ocorre também uma modificação na possibilidade de expressão do DNA (COSGROVE et al., 2004). Os eucariotos contêm pelo menos cinco famílias de remodeladores de cromatina: SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2, INO80 e SWR1 (SAHA et al., 2006). O complexo SWI/SNF, um dos mais estudados, regula a expressão gênica através de elementos promotores e regulatórios (KNOTT et al., 2006). Trata-se de um complexo protéico ATP-dependente que está envolvido em aspectos críticos do crescimento celular e na estabilidade do genoma (KADAM; EMERSON, 2003). Foi primeiramente identificado em leveduras, sendo altamente conservado entre os eucariotos (PETERSON; WORKMAN, 2000).

A BRG1 (*brahma related gene*) é uma importante subunidade protéica do complexo SWI/SNF, e parece apresentar uma importância crucial nos eventos da reprodução. A expressão da BRG1 em oócitos (BULTMAN et al., 2000) e embriões (BULTMAN et al., 2006) de camundongos evidenciam a participação desta proteína na foliculogênese e embriogênese. Oócitos nulos para a expressão da BRG1 completaram a meiose e foram fecundados, porém, os embriões concebidos tiveram seu desenvolvimento interrompido no estágio de 2 a 4 células, com a atividade transcricional reduzida em 30% dos genes, o que sugere o envolvimento desta proteína na ativação do genoma embrionário e como marcador da qualidade oocitária e embrionária (BULTMAN et al., 2006). A ausência da expressão da BRG1 também foi associada à letalidade embrionária precoce (BULTMAN et al., 2000).

Admite-se que o complexo processo da foliculogênese em ovários mamíferos é regulado por um coordenado programa entre elementos genômicos e epigenéticos (RUIZ-CORTÉS et al., 2005). Relacionando a epigenética com o processo de foliculogênese, um estudo mostrou que a fosforilação do aminoácido de número 10, uma serina da histona H3, foi relacionada com atividade transcricional favorável ao processo de divisão celular (HANS; DIMITROV, 2001). Por sua vez, esta modificação da H3 apresentou-se vinculada à ação tanto do FSH como do estradiol, durante o período pré-ovulatório, comprovando a estreita relação desta alteração na cromatina com a regulação do crescimento folicular (RUIZ-CORTÉS et al., 2005).

Além da serina 10 da H3, o aminoácido de número 4 da H3, uma lisina (K), tem despertado o interesse dos pesquisadores. A H3K4 e a enzima reguladora da sua metilação – *Lysine Specific Demethylase 1* (LSD1) – parecem exercer um papel central no comando da expressão gênica, não só na meiose das células germinativas, mas também nas células de suporte, como demonstrado recentemente na espermatogênese em camundongos (GODMANN et al., dados não publicados) e na oogênese para *Drosophila* (Di STEFANO et al., 2007).

Em mamíferos, os primeiros resultados indicam intensa atividade da H3K4 no oócito, desde o estágio de folículo primordial até os grandes folículos antrais. Para as células da granulosa e da teca, diferentes padrões foram identificados, conforme o número de metilações. Enquanto a mono e a di-metilação da H3K4 aparentemente restringem suas atividades aos folículos antrais, a H3K4 tri-metilada foi identificada mais precocemente, em folículos primários e secundários, possivelmente exercendo um papel na regulação dos vários fatores locais envolvidos com o crescimento folicular nesta fase. A LSD1 não foi identificada em nenhuma etapa pré-ovulatória, sugerindo uma atividade ampla e ininterrupta da H3K4 ao longo de todo o crescimento folicular (SENEDA et al., 2008).

Um aspecto particularmente interessante é o papel da epigenética no controle da pluripotência de células-tronco (SURANI et al., 2007), e especialmente a atuação da H3K4 no restabelecimento da pluripotência em células somáticas, ou transdiferenciação (KIMURA et al., 2004; LIN; DENT 2006).

Concluindo, o conceito do estoque finito de gametas femininos é um fato bem estabelecido e foi comprovado diversas vezes nas últimas décadas. Mas a capacidade de diferenciação de células-tronco tem sido cada vez mais surpreendente e células complexas, como neurônios e hepatócitos, já foram obtidas

a partir de células-tronco adultas. Considerando a recente constatação de como a epigenética pode interferir na capacidade de expressão gênica, a possibilidade de diferenciação de células-tronco em oócitos por mecanismos epigenéticos parece ser cada vez mais evidente. Uma vez que trabalhos recentes têm demonstrado a importância da participação epigenética na foliculogênese, a pergunta a ser feita é: seria a epigenética a chave para a compreensão da hipótese da renovação folicular pós-natal? Neste cenário inédito e promissor, outra pergunta se apresenta: seria compatível a co-existência de ambos os modelos, ou seja, a produção de oócitos na fase fetal e, sob condições específicas, a neo-formação folicular?

A raça Nelore pode ser um excelente modelo biológico para a elucidação de algumas dessas questões. A surpreendente quantidade de oócitos obtida naturalmente a partir de fêmeas dessa raça sinalizam claramente para isso.

As evidências sugerem algo novo, porém mais investigações são necessárias. A Ciência requer sempre o espírito crítico e isento de investigação, sem ceticismo gratuito ou impulsividade. Podemos estar diante de uma modificação extraordinária do conceito de foliculogênese, com potenciais reflexos na TE, FIV e IATF e todo o segmento da reprodução. Cabe a cada um de nós buscar a constante atualização e a análise crítica dos artigos, para que os conceitos reais sejam encontrados.

Referências Bibliográficas

Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A, Randazzo F, Metzger D, Chambon P, Crabtree G. A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, v.6, p.1287–1295, 2000.

Bultman S, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda T, Schultz RM, Magnuson T. Maternal BRG1 regulates zygote genome activation in the mouse. *Gene Dev*, v.20, p.1744-1754, 2006.

Buratini Jr J, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti IC, Barros CM, Cao M, Nicola ES, Price CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, v.130, p.343-350, 2005.

Byskov AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY. Eggs forever? *Differentiation*, v.73, p.438-446, 2005.

Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet*, v.13, p.727-739, 2004.

Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and histone code. *Nature*, v.11, p.1037-1043, 2004.

Cosgrove MS, Wolberger C. How does the histone code work? *Biochem Cell Biol*, v.83, p.468-476, 2005.

Di Stefano L, Ji JY, Monn NS, Herr A, Dyson N. Mutation of drosophila LSD1 disrupts H3-K4 methylation, resulting in tissue-specific defects during development. *Curr Biol*, v.17, p.808-812, 2007.

Dyce PW, Lihua W, Li J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology*, v.8, p.384-390, 2006.

Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, v.441, p.1109-1114, 2006.

Eppig JJ, Schroeder AC, O'Brien MJ Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J Reprod Fertil*, v.95, p.119-127, 1992.

Goldeberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, v.128, p.635-638, 2007.

Hans F, Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Nature*, v.20, n.24, p.3021-3027, 2001.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v.428, p.145-150, 2004.

Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee H, Adams G, Niikura Y, Tschudy K, Tilly J, Cortes M, Forkert R. Oocyte Generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v.122, p.303-315, 2005.

Kadam S, Emerson BM. Transcriptional Specificity of Human SWI/SNF BRG1 and BRM Chromatin Remodeling Complexes. *Mol Cell*, v.11, p.377-389, 2003.

Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, v.434, p.583-589, 2005.

Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Histone Code Modifications on Pluripotential Nuclei of Reprogrammed Somatic Cells. *Mol Cell Biol*, v.24, p.5710-5720, 2004.

Knott JG, Palmer S, De Matos DG. P-226 Search for epigenetic markers of oocyte and embryo quality: Elucidation of role of Brg1 (*brahma-related gene 1*) in embryo development in mouse. *Fertil Steril*, v.86, n.3, p.S217-S218 J, 2006 (Supplement 1).

Lin W, Dent SYR. Functions of histone-modifying enzymes in development. *Curr Opin Genet Dev*, v.16, p.137-142, 2006.

Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*, 2007 (in press).

Mellor J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet*, v.22, n.6, p.320-329, 2006.

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, v.108, p.475-487, 2002.

Nonato Jr I, Rufino FA, Sanches BV, Pontes JHF, Uvo S, Ereno Jr JC, Seneda MM. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.95, 2004.

Peterson CL, Workman JL. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*, v.10, p.187-192, 2000.

Ruiz-Cortés TZ, Kimmins S, Monaco L, Burns KH, Sassone-Corsi P, Murphy BD. Estrogen mediates phosphorylation of histone H3 in ovarian follicle and mammary epithelial tumor cells via the mitotic kinase, aurora B. *Mol Endocrinol*, v.19, n.12, p.2991-3000, 2005.

Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature*, v.7, p.437-447, 2006.

Santos RG, Soto MAB, Lourenço RX, Stranieri P, Bishop W, Accorsi MF, Watanabe MR, Dayan A, Watanabe YF. Aspiraço folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. *Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, v.16, p.79, 2005.

Seneda MM, Godmann M, Murphy BD, Kimmins S, Bordignon V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. *Reproduction*, v.135, p.829-838, 2008.

Soto-Suazo M, Zorn TM. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Anim Reprod*, v.3, p.147-160, 2005.

Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, v.128, p.747-762, 2007.

Tilly JL, Johnson J. Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary: is an absence of marker gene expression really acceptable evidence of an absence of oogenesis? *Cell Cycle*, v.6, n.8, p.879-883, 2007.

Trotter KW, Archer TK. Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Mol Cell Endocrinol, Review*, p.162-167, 2007.

van den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update*, v.6, p.457-474, 2000.

van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.

Waldeyer W. Eierstock und Ei, Leipzig: Engelmann, 1870.

Weinhold B. Epigenetics: The science of change. *Environ Health Persp*, v.114, p.160-167, 2006.

ARTIGO 2

“Comparison of oocyte production among *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* donor cows”

Submetido ao periódico *Theriogenology* em 20 de dezembro de 2008.

Comparison of oocyte production among *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* donor cows

K.C.F. Silva¹; A.C. Basso²; G.M.G. Santos¹; B.V. Sanches²; J.P.F. Porcionato²;
F.A.M. Sterza¹; J.H.F. Pontes¹⁻²; M.M. Seneda^{1,*}

1 Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina PR, 86051-990
Brazil

2 In vitro Brasil Ltda. Mogi Mirim SP, 13800-970 Brazil

* Corresponding author: Marcelo Marcondes Seneda. Laboratório de Reprodução
Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina, PR, 86051-990, Brazil. Phone 55 (43) 3371-4064
Fax 55 (43) 3371-4063 mseneda@uel.br

Abstract

In the recent years, Brazil has become the leading country in the world for the number of embryos produced *in vitro*. This is partly due to the large numbers of *Bos indicus* in Brazil, making up about 80% the total cattle. The mean oocyte production per ultrasound-guided follicular aspiration from *Bos indicus* is higher those for European breeds. In the present study, we analyzed 5,407 ovum pick up (OPU) and compared the production of total (n = 90,086) and viable (n = 64,826) oocytes from Gir (*Bos indicus*), Holstein (*Bos taurus*), 3/4 Holstein x 1/4 Gir, and 1/2 Holstein-Gir crossbreed cows. To obtain oocytes OPU/IVP was repeated from 4 to 7 times (5.7 ± 2.4) in each donor cow during a 12-mo period. On average, 16.7 ± 6.2 oocytes were obtained per OPU procedure and 71.96% were considered viable. The mean numbers of total oocytes per OPU procedure were 17.1 ± 4.4 for Gir cows (n =3,778), 11.4 ± 3.9 for Holstein cows (n =1,138), 20.4 ± 5.8 for 3/4 Holstein x 1/4 Gir (n =267), and 31.4 ± 5.6 for 1/2 Holstein-Gir crossbreed females (n =224, P<0.01). The mean numbers of viable oocytes per OPU procedure were 12.1 ± 3.8 for Gir cows, 8.0 ± 2.6 for Holstein cows, 16.8 ± 5.0 for 3/4 Holstein x 1/4 Gir, and 24.3 ± 4.7 for 1/2 Holstein-Gir crossbreed females (P<0.01). Interestingly, our results demonstrate the highest mean of oocytes from 1/2 *taurus* X 1/2 *indicus* donors and not for *Bos indicus* females.

Keywords: Oocytes. Ovum pick up. IVF. Cattle. *Bos indicus*.

1. Introduction

In almost all countries, the *in vivo* method of cattle embryo production is preferred. However, in the Brazilian herd, there is a strong preference for using the *in vitro* system to substitute for MOET [1]. As we have recently described [2], there are specific reasons for this. The most popular breed in Brazil is Nelore (*Bos taurus indicus*) and we have demonstrated that a unique aspect of this breed is high oocyte production [2]. Besides the predominance of *Bos taurus indicus* (or Zebu) breeds and the number of oocytes, it is important to consider the increasing marketing of Zebu breeds, as well the expansion of private companies performing *in vitro* embryo production in Brazil. It is also important to mention the recent interest in other tropical countries in acquiring *Bos indicus* genetics from the Brazilian herd [3].

Even in countries where *in vivo* embryo generation is preferred, *in vitro* production of bovine embryos is considered to be an important tool for increasing the reproductive efficiency of cattle of high genetic value [4]. The *in vitro* process begins with oocyte harvesting, with the oocytes varying in number and quality due to several aspects. The quality of the oocytes has a strong influence on the efficiency of maturation, fertilization, and *in vitro* culture systems [5-7].

All factors that interfere with the oocyte recovery rate should be considered mainly as biological and technical variables [8-11]. Results of follicular aspiration depend on the interval between aspirations, follicular development, hormones, experience of the practitioner, and many other factors [12-15]. However, since the basic procedures for *in vitro* embryo production have been accepted throughout the world, it will be interesting to better understand the influence of the cattle breed on follicular growth and oocyte yield.

Many differences in follicles and oocytes have been described in Zebu as compared with European breeds [16-18]. Usually, *Bos indicus* donors tend to present more follicular waves [17,18] and a larger population of small follicles (< 5 mm) compared to *Bos taurus* breeds [19]. Furthermore, Nelore cows have smaller dominant follicles and CLs, with shorter estrus than *Bos taurus* breeds [20,21]. However, none of these comparisons is as peculiar as the high number of oocytes that can be obtained from Zebu females [2]. Nevertheless, as of yet, there is no biological explanation of this intriguing difference in the reproductive physiology of these cows.

When there is difficulty getting the expected number of embryos from MOET in European cattle, the most common procedure done for oocyte recover has been OPU [22]. However, technology in the IVF industry has been greatly improved in recent years, and it would be interesting to reevaluate oocyte recovery from *Bos taurus* donors without reproductive problem, using technical improvements in the follicle aspiration, as well using practitioners with greater expertise.

Another interesting factor that has not been addressed using OPU is the oocyte production from European x Zebu crossbreeds. For Holstein cows, mean values of 4.1 [23] to 9.9 oocytes [24] per OPU session are standard. Three to four times more oocytes have been harvested from Zebu donors, with averages ranging from 18 to 25 recovered oocytes per OPU session [25-27]. Despite the great interest in taurus-indicus crossbreeds, which usually have the combined best characteristics from both breeds, there is a lack of information about this topic in the literature. There is particularly great interest in embryo production from the Holstein-Gir, a very popular Brazilian milk cattle crossbred from Holstein and Gir (*indicus*) because many countries in the world are interested in their ability to generate a large amount of milk with a strong resistance to the tropical environment.

The aim of the present study was to present data of oocyte production from *Bos taurus* (Holstein), *Bos indicus* (Gir), and Holstein-Gir (Holstein x Gir) breeds. All data were collected from one of the biggest Brazilian embryo centers, In Vitro Brasil.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Non-pregnant, healthy, and cycling Gir (*Bos indicus* n =617), Black-and-White Holstein (*Bos taurus* n = 180), 3/4 Holstein x 1/4 Gir (n =44), and 1/2 Holstein-Gir (n =37) cows were used as oocytes donors. The average body condition score was 3.5 ± 0.5 (scale 1 to 5) [28] and the age ranged from 3 to 7 years (5 ± 2.3). All animals were selected on the basis of genetic merit and had regular ovarian activity (based on transrectal palpation and ultrasonography). All cattle were submitted to OPU (5,407 procedures) with an average of 5.7 ± 2.4 (4 to 7) OPU performed per donor cow. Because the experiments were conducted in a commercial embryo production center, animals were randomly used in OPU without a specific schedule

or predetermined sequence. For each donor cow there was a minimum interval of 15 days between OPU. None of the females were submitted to hormonal treatment before OPU. Experiments were conducted over a 12 month interval in a commercial embryo production center located in Mogi-Mirim, São Paulo, Brazil.

2.2. Donor preparation

Before each procedure, feces were removed from the rectum and the perineal area was cleaned with tap water and 70% ethanol. Prior to OPU, each cow received epidural anesthesia using 7 mL of 2% lidocaine (Anestésico L, Pearson, São Paulo, São Paulo, Brazil) to decrease peristalsis and discomfort.

2.3. Follicle aspiration

Animals were used independent of their estrous cycle stage. Previously described procedures were used for follicular aspiration [23]. Briefly, each visible follicle was aspirated using a real-time B-mode ultrasound scanner (Scanner 200 Vet, Pie Medical, Maastricht, The Netherlands), a 7.5 MHz convex array transducer fitted into the intravaginal device (Pie Medical), and a stainless steel guide. Follicular puncture was performed using a disposable 19 gauge 1/2" hypodermic needle (Becton Dickinson, Curitiba, Parana, Brazil) connected to a 50 mL conical tube (Corning, Acton, MA, USA) via silicon tubing (0.8 m; 2 mm id). Aspiration was performed using a vacuum pump (Cook Veterinary Products, Queensland, Australia) with a negative pressure of 10-12 mL of water/min. The collection medium was TCM 199 (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 25 mM hepes (Sigma H-0763), 5% fetal calf serum (FCS), 50 µL/mL gentamycin sulfate (Schering-Plough, São Paulo, São Paulo, Brazil), and 10,000 IU/L sodium heparin (Sigma H-3149).

2.4. Oocyte Evaluation

Immediately after recovery, the aspirated material from the follicles were washed and filtered through an Emcom Embryo filter with phosphate buffer solution (PBS-Nutricell, Brazil). The cumulus oocyte complex were classified according to the

presence of cumulus cells and the oocyte aspect using the following criteria: good – more than three layers of cumulus cells, regular –at least one layer, denuded –partly or not covered by cumulus cells, and atretic –dark cumulus oophorus and signs of cytoplasmic degeneration [23]. After evaluation, the atretic oocytes were recorded and discarded. The regular and good oocytes were classified as viable oocytes.

To estimate the mean number of follicles present in the ovaries of donor cows at the OPU session, we used an oocyte recovery rate of 80% on the basis of the mean recovery rates reported by Bols et al [29] and Gimenes et al. [30].

2.5. Statistical analysis

The comparison of production of recovery and viable oocytes per donor cow and the number of follicles presents in the ovaries at the moment of ultrasound-guided follicular aspiration were analyzed by analyses of variance ANOVA. The comparison between breeds was done using the Tukey test.

3. Results

A total of 90,086 oocytes were collected in 5,407 OPU sessions. We performed 3,778 ultrasound-guided follicular aspiration of ovaries of Gir cows, 1,138 of Holstein cows, 267 of 3/4 Holstein x 1/4 Gir, and 224 of 1/2 Holstein-Gir crossbreed cows. On average, 16.7 ± 6.27 oocytes were obtained per procedure and 71.96% (64,826/90,086) were considered viable, generating an average of 12.0 ± 4.39 viable oocytes per procedure.

Gir cows (*Bos indicus*) had a higher production of recoverable and viable oocytes per procedure, on average 17.1 ± 4.46 (Fig.1) and 12.1 ± 3.86 (Fig.2), respectively, when compared with Holstein cows, who had the lowest production of all the breeds, generating, on average, 11.4 ± 3.92 recoverable oocytes per procedure (Fig. 1) and 8.0 ± 2.67 viable oocytes per procedure (Fig. 2) ($P < 0.01$).

Compared with other donor cows, 3/4 Holstein x 1/4 Gir and 1/2 Holstein-Gir crossbreed females had the best production, on average 20.4 ± 5.85 and 31.4 ± 5.60 recoverable oocytes per procedure, respectively (Fig. 1), and 16.8 ± 5.04 and 24.3 ± 4.74 viable oocytes per procedure (Fig. 2), respectively ($P < 0.01$).

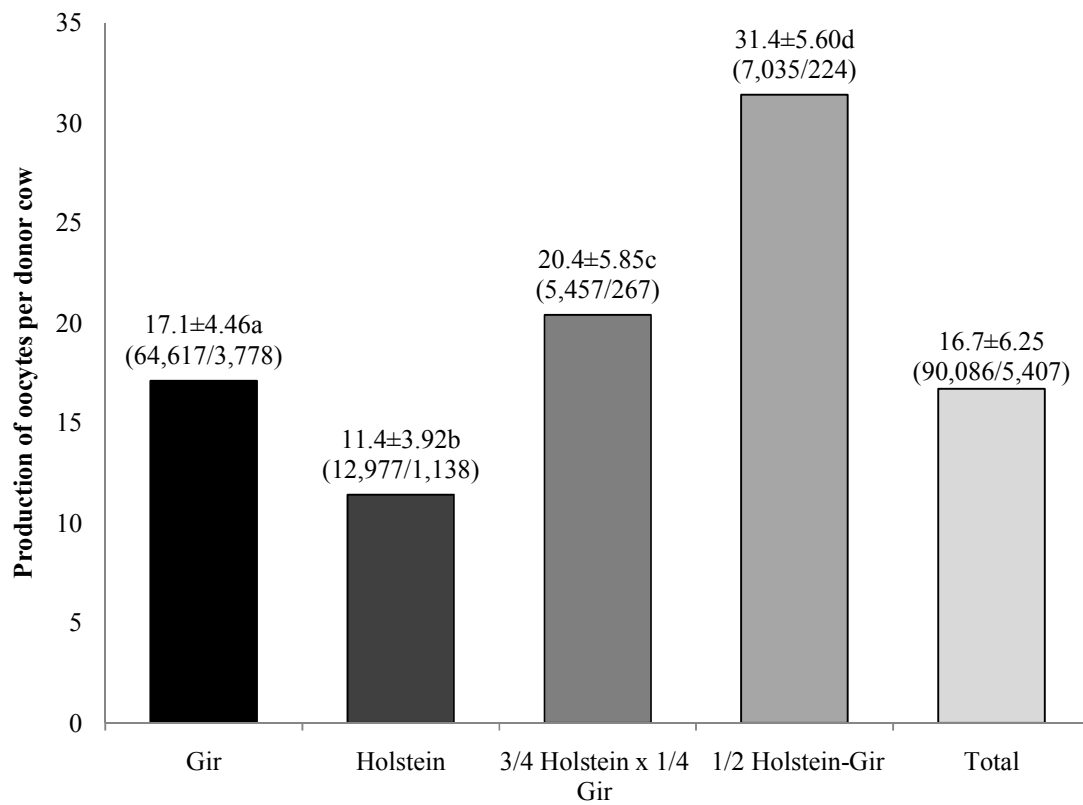


Figure 1. Production of oocytes per donor (\pm SEM) obtained from Gir, Black-and-White Holstein (BWH), 3/4 Holstein x 1/4 Gir, and 1/2 Holstein-Gir crossbred donor cows. Means for the same characteristic differ statistically ($P < 0.01$).

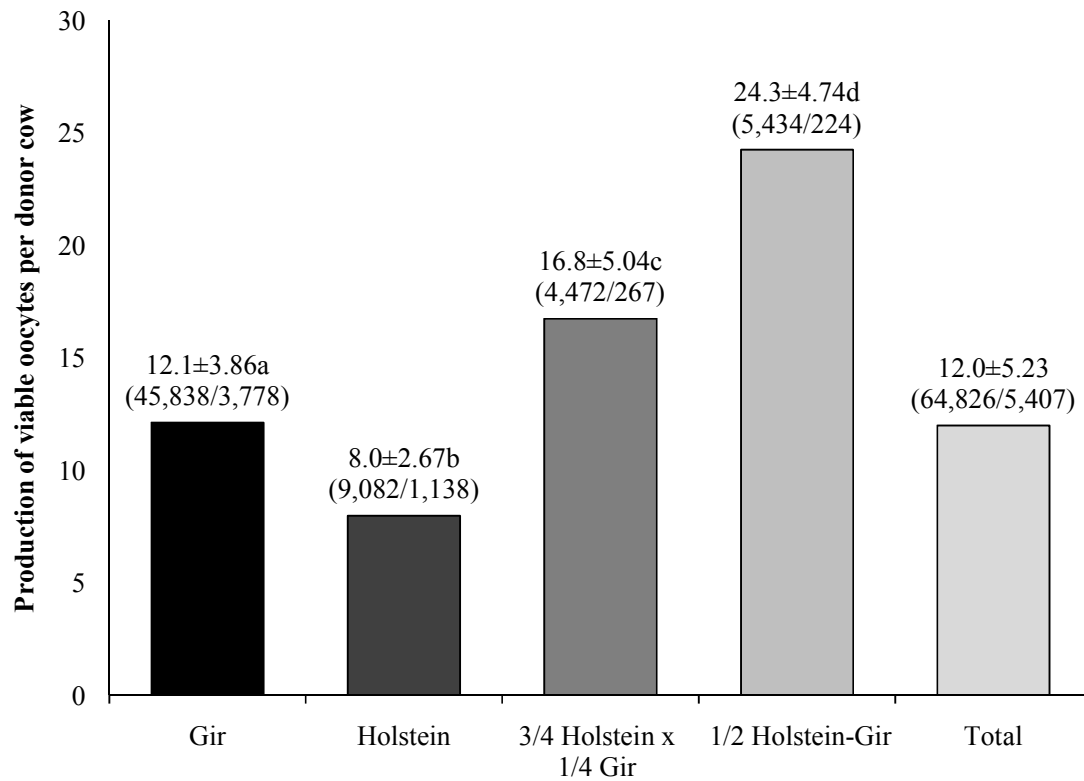


Figure 2. Production of viable oocytes per donor (\pm SEM) obtained from Gir, Black-and-White Holstein (BWH), 3/4 Holstein x 1/4 Gir, and 1/2 Holstein- Gir crossbreed donor cows. Means for the same characteristic differ statistically ($P < 0.01$).

The estimated mean number of follicles present in the ovaries of donor cows at the time of the OPU procedure, based on an oocytes recovery rate of 80%, is shown in Figure 3.

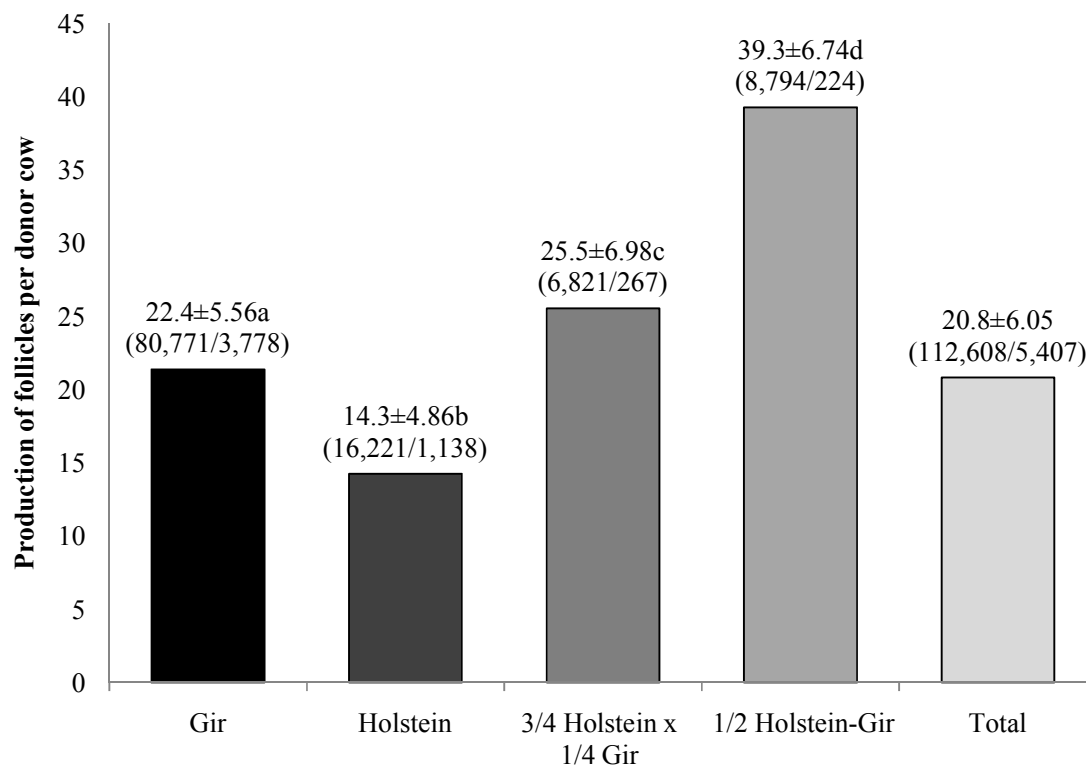


Figure 3. Estimated mean number of follicles (\pm SEM) present in the ovaries of donor cow at the time of ultrasound-guided follicular aspiration on the basis of a recovery oocyte rate of 80%. Means for the same characteristic differ statistically ($P < 0.01$).

4. Discussion

The high oocyte production in Nelore cows (*Bos indicus*) has been considered a key aspect in explaining why Brazil has been considered the best in the world for *in vitro* embryo production [2]. In the present work, we present for the first time a comparison of oocyte production data from other breeds in Brazil, showing a new direction for the embryo industry. In addition, comparisons between *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds were very scarce in the literature and we collected data from taurus, indicus and two taurus/indicus crossbreeds to fill in this gap.

In the present work, the number of recoverable oocytes from Holstein cows (11.4 ± 3.92) is very high if compared with the results generated by [22], who obtained an average of 4.1 oocytes per OPU session. The number of recoverable oocytes from Holstein cows is also high if compared to our previous studies using Holstein cows [23], which was 4.1 oocytes per OPU session on average. However, this was similar to the results reported by Bousquet et al. [24] that reported an average of 9.5 (4,145/437) oocytes collected per OPU session. Our high average (11.4 ± 3.92) should be considered representative due to the amount of procedures performed – 1,138. We believe that two factors can explain this high average. First of all, we only used donors without any reproductive problems. Secondly, this high oocyte yield from Holstein donors is partly due to the experience of the OPU team. Veterinarians from the embryo center usually perform 15 to 20 follicle aspirations per day, every workday, and this allows for them to gain greater expertise in this procedure. Considering these two factors, other teams can obtain the same or even higher averages of oocytes.

The number of recoverable oocytes per OPU session with Gir cows (17.1 ± 4.46) can be considered high when compared with the results reported by Viana et al. [31]. These authors reported collecting an average of 11.6 oocytes per OPU session from Gir cows. However, our data are similar with those reported by the same authors [32], showing an average 18.8 oocytes per procedure. Due to the amount of OPU procedures performed in the present study– 3,778 – we believe that an average of 17 to 18 oocytes is representative of this breed. However, when comparing this with Nelore, another Zebu breed, the oocyte production from Gir donors seems to be quite low. As we recently described [2], an average of 25.6 ± 15.3 oocytes was obtained from Nelore donors, approximately 7 to 8 more oocytes

than the amount reported for Gir cows. The variation in oocyte yield in Zebu cows seems to be related to gene sequence, at least for the Nelore breed [33]. These authors performed studies with genetic sequencing of Nelore donors according to the oocyte production. The genes *GDF9*, *FGF8*, *BMP15*, and *BMP15* receptor were analyzed. Considering only the *FGF8* effect, these authors reported an increase of 2.26 ± 1.08 oocytes on average and a possible variation of 7.36 ± 1.12 oocytes when all genes were considered together. Despite this promising study, there are several factors to be addressed concerning oocyte yield in Zebu cattle. High oocyte production seems to be a unique aspect of *Bos indicus* breeds and the total number of follicles in *Bos indicus* ovaries remains to be better established. Some reports indicate that the number of primordial and primary follicles in *Bos indicus* ovaries is similar to European breeds, but there is a lack of data on this subject [34]. Perhaps *Bos indicus* females have a larger number of germinal cells at the fetal stage or even a longer period of mitosis during the formation of oogonia. Distinctive mechanisms of follicular atresia can also explain the high oocyte production from *Bos indicus* females. The controversial hypothesis of follicular renewal [35,36] seems plausible for Zebu cows. However, this new concept needs to be better recognized before being considered [37,38]. We are currently investigating the pre-antral follicular population in Zebu animals to help provide us with more explanation of these striking findings.

Some *Bos indicus* females produce an intriguingly high average number of oocytes. As we recently described [2], some Nelore donors have a consistently high oocyte yield, with averages of more than 60 oocytes after several OPU procedures. However, we have no explanation for why some animals produce hundreds of oocytes from one single follicle aspiration, a situation not uncommon in all embryo centers investigated. Our team obtained 251 oocytes recovered in one OPU session done in a Nelore cow (Seneda MM, unpublished data) and higher means of up to 564 oocytes reported by other teams [39]. This is certainly one reason to motivate other groups around the world to study folliculogenesis in Zebu cattle.

We have shown that we can clearly obtain more oocytes from Zebu cows than European cattle and feel that we must also consider a technical explanation for the OPU results. We believe that we generated a higher efficiency oocyte recovery rate due to biological aspects (follicle development) as well as the experience of the team. To explain the better efficiency of oocyte recovery per OPU in Zebu cows, it is

important to consider that these animals tend to have more number of follicles per wave as compared to European breeds [40]. In addition, Nelore cows usually have three follicular waves per cycle, with occasional reports of four waves [17,18], which is more than the two or three waves described in Holstein cows [41,42]. Additionally, there is a larger population of small antral follicles (< 5mm) in *Bos indicus* compared to *Bos taurus* cattle [19]. Taken together, we can spontaneously expect to find a large population of small follicles in Zebu donors. Due to the smaller volume of follicular fluid, a possible lower intra-follicular pressure, and a smaller amount of material (follicular fluid and oocyte) to be aspirated, the chance of oocyte loss when aspirating small follicles would be reduced [23]. The other aspect regarding the efficiency of oocyte recovery is the experience of the team. In the present study, OPU is the only technique performed by the veterinarians on all days. After several months, this allows not only for strong technical knowledge, but also a great understanding of the equipment. The expected result is a high efficiency oocyte recovery rate, perhaps more than the 80% we considered to be the estimated follicle population (Fig.3). In other countries, it is usual for a practitioner to perform several activities and the situation in Brazil – staff dedicated full time to OPU – may contribute to the high oocyte yield we have described.

This study presents that both the number of recoverable and viable oocytes was higher for Holstein-Gir crossbreed cows when compared with Gir (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. Therefore, as the degree of relatedness to *Bos taurus* breed increased, the oocytes production became lower. We have already observed this situation in a previous study, when we conclude that the increase of the degree of Nelore (*Bos indicus*) genetics on racial composition promoted an increase in oocyte production and a *Bos taurus* x *Bos indicus* crossbreed promoted intermediate results [26]. In this work, the mean number of oocytes obtained from Nelore females (*Bos indicus*) was 18.4, 13.6 from Canchim (5/8 Charoles x 3/8 Nelore), and 3.7 from Aquitania females (*Bos taurus*).

All data described here were obtained without hormone stimulation. As described earlier by our team, the number of oocytes obtained from Nelore females by ultrasound-guided follicular aspiration did not increase with ovarian superstimulation [43]. This is one intriguing aspect not well understood for *Bos indicus* breeds. Another unexplained factor is a tendency to produce lower averages

of embryos when performing MOET [44]. As with the other aspects mentioned above, the question of hormone stimulation on Zebu breeds remains to be better explained.

The number of oocytes obtained per OPU session from 1/2 Holstein-Gir (31.4 ± 5.6) in the present study can be considered high when compared with the average number of oocytes obtained per procedure from *Bos taurus* x *Bos indicus* crossbreeds [45,30]. The mean number of oocytes recovered per OPU session from 1/2 Holstein-Gir is also higher than the mean number obtained from Gir (10 to 18) [46,32] and Nelore cows (18 to 25)[26-28].

Despite the great importance of Nelore cattle to the Brazilian IVF industry, we present a large amount of data on Gir, another indicus breed. In addition, we present results from Holstein donors without reproductive problems, which is quite rare and promising due to the high averages obtained. Finally, we have clearly demonstrated the influence of indicus blood on oocyte production by comparing two levels of indicus/taurus breeds. In conclusion, we consider that these data may be useful for all embryo centers interested in IVF technology. A better understanding of all aspects affecting oocyte production should benefit the embryo industry, facilitating the application of other reproductive biotechnologies, such as transgenesis and cloning.

References

- [1] Thibier M. Transfers of both *in vivo*-derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. IETS Embryo Transfer Newsletter 2006;24:11–19.
- [2] Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology 2009; 71(4): 690-97.
- [3] Nasser LF, Rezende LF, Bó GA, Barth A. Induction of parturition in Zebu-cross recipients carrying *in vitro*-produced *Bos indicus* embryos. Theriogenology 2008;69:116–23.
- [4] van Wagendonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. Theriogenology 2006;65:914-25.
- [5] Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. Theriogenology 1996;45(5),943-56.
- [6] Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. Mol Reprod Dev 2000;57(2):204-9.
- [7] Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. Theriogenology 2000;53(1):11-20.
- [8] Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede, JMM, Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. Theriogenology 1996;45:1001-14.
- [9] Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N, Yamada M. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. Theriogenology 1999;51(4):757-65.
- [10] Hashimoto S, Takakura R, Minami N, Yamada M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. Theriogenology 1999;52(1):131-8.
- [11] Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. Theriogenology 2000;54(3):433-46.
- [12] Gibbons JR, Beal WF, Krisher RJ, Faber FG, Pearson RF, Gwazdauskas FC. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. Theriogenology 1994;42:405-19.
- [13] Kruip TA, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MW, Pieterse MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. Theriogenology 1994;42(4):675-84.

- [14] Boni R, Roelofsen MW, Pieterse M, Kogut J, Kruip TA. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 1997;48(2):277-89.
- [15] Garcia A, Salaheddine M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 1998;50(4):575-85.
- [16] Rhodes FM, Fitzpatrick LA, Entwistle KW, De'ath G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *J Reprod Fertil* 1995;104(1):41-9.
- [17] Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Sole JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 1997;47:1489-1505.
- [18] Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2000;35:2501-9.
- [19] Segerson EC, Hansen TR, Libby DW, Randel RD, Getz WR. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *J Anim Sci* 1984;59:1026-46.
- [20] Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 2005;63:2382-94.
- [21] Rhodes FM, De'ath G, Entwistle KW. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci* 1995;38:265-77.
- [22] Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995;43:141-52.
- [23] Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. *Ani Reprod Sci* 2001;67:37-43.
- [24] Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1999;51(1):59-70.
- [25] Thibier M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. *IETS Embryo Transfer Newsletter* 2004;22:12-19.
- [26] Rubin KCP, Pontes JHF, Nonato-Junior I, Ereno-Junior JC, Pansard H, Seneda MM. Influence of Nelore blood on the *in vivo* production of oocytes. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005;33(Suppl1):183(Abstract).
- [27] Watanabe MR, Watanabe YF, Franceschini PH, Dayan A, Lobo RB. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 1999;51:438(Abstract).
- [28] Lowman BG, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle, Revised edition. East Scotland College of Agriculture, p.1-31, 1976 (Bulletin 6).
- [29] Bols PEJ, Leroy JLMR, Viana JHM. Technical and biological aspects of ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in the cow: an overview. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005;33(Suppl 1):103-18 (Abstract).

- [30] Gimenes LU, Ferraz ML, Almeida RG, Dias FBR, Pereira FMM, Araújo AB, Joaquim DC, Watanabe Y, Meirelles FV, Torres-Júnior JRS, Ayres H, Madureira EH, Baruselli PS. Effect of OPU day (2, 4 or 6 days after follicular wave emergence) on bovine *in vivo* recovery rate and oocyte quality – Part 1. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007;35(Suppl 3):1170 (Abstract).
- [31] Viana JHM, Camargo LSA, Ferreira AM, A WF, Fernandes AC, Marques Junior AP. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Anim Reprod Sci* 2004;84(1-2):1-12.
- [32] Viana JHM, Palhão MP, Arashiro EKN, Ferreira AM, Fonseca JF, Fernandes CAC. Pre-synchronization of cows for cumulus-oocyte complexes recover: Partial results. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004;32:187 (Abstract).
- [33] Biase FH, Merighe GKF, Biase WKFS, Martelli L, Meirelles FV. Global poly(A) mRNA expression profile measured in individual bovine oocytes and cleavage embryos. *Zygote* 2008;16: 29-38.
- [34] Lucci CM, Rumpf R, Figueiredo JR, Bão SN. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology* 2002;57:1467–83.
- [35] Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004;428:145-50.
- [36] Johnson J, Bagley J, Skaznik-wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Nikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Eorkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell* 2005;122:303-15.
- [37] Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 2006;441:1109-14.
- [38] Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 2007;306:112-20.
- [39] Santos RG, Soto MAB, Lourenço RX, Stranieri P, Bishop W, Accorsi MF, Watanabe MR, Dayan A, Watanabe YF. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. *Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, p. 79, 2005.
- [40] Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 2008;69:167-75.
- [41] Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 1988;83:663-71.
- [42] Wolfenson D, Inbara G, Rotha Z, Kaimb M, Blocha A, Braw-Tal R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 2004;62:1042-55.
- [43] Blaschi W, Andrade ER, Nonato Ijr, Pontes JHF, Ereno JrJC, Uvo S, Seneda MM. Pluset prior follicle aspiration: Impact on *in vitro* embryo production in *Bos indicus* cows. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004;32(Suppl 1):186(Abstract).

- [44] Peixoto MGCD, Bergmann JAG, Fonseca CG, Penna VM, Pereira CS. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2006;58(4):567-74.
- [45] Pfeifer LF, Schneider A, Castilho EM, Luz EM, Ataíde PF, Dionello NJL, Pivato I, Rumpf R, Corrêa MN. Effect of progesterone in oocyte donors cows on follicle development and *in vitro* embryo production. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005;33(Suppl 1):184 (Abstract).
- [46] Torres-Júnior JRS, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C, Clemente CAA, Sá Filho MF, Souza AH, Baruselli PS. Effect of presence of corpus luteum at the time of follicular aspiration on oocyte recovery and *in vitro* competence in *Bos indicus* cattle. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006;34(Suppl 1):470 (Abstract).

ARTIGO 3

“Estimativa da população folicular ovariana pré-antral de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*”

Estimativa da população folicular ovariana pré-antral de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*

RESUMO

Fêmeas *Bos indicus* apresentam produção *in vivo* de oócitos muito superior a fêmeas *taurus*. Uma possível explicação para este evento seria a maior população de folículos pré-antrais de fêmeas *indicus*. Neste trabalho, foi apresentada uma comparação entre a população de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* (Nelore) e *Bos taurus taurus* (Aberdeen Angus). Ovários de fetos (n=10) e novilhas Nelore (n=12), e de fetos (n=10) e novilhas Aberdeen Angus (n=12) foram coletados em abatedouros e submetidos a processamento histológico para contagem de folículos pré-antrais. Não houve diferença entre o número médio de folículos pré-antrais presente nos ovários de fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* ($p>0,05$). O número médio de folículos pré-antrais por ovário foi 143.929 ± 253 e 285.155 ± 570 para fetos, *indicus* e *taurus*, e 76.851 ± 280 e 109.673 ± 293 para novilhas, *indicus* e *taurus* ($p>0,05$). A quantidade de folículos obtida por animal foi marcada por uma grande variação entre os indivíduos da mesma categoria e entre as raças. Em novilhas *indicus* e *taurus* foram identificadas estruturas de aglomerados de oócitos e cordões foliculares, normalmente descritas apenas nos ovários em fase fetal. Concluimos que a quantidade de folículos pré-antrais não explica a maior produção *in vivo* de oócitos em fêmeas *indicus*, e que provavelmente outros mecanismos sejam responsáveis por esta ocorrência.

Palavras-chave: População folicular. Feto. Novilha. *Bos indicus*. *Bos taurus*.

1. INTRODUÇÃO

A liderança do Brasil na produção *in vitro* de embriões (THIBIER, 2007) possui relação direta com o número de folículos e oócitos obtidos de fêmeas *Bos taurus indicus* (PONTES et al., 2009) e este aspecto tem estimulado vários grupos a buscar uma melhor compreensão das diferenças entre fêmeas zebuínas e taurinas. Admite-se para fêmeas *indicus* um número maior de ondas foliculares (FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000) e mais folículos recrutados por onda do que fêmeas *Bos taurus taurus* (CARVALHO et al., 2008). Vacas Nelore (*Bos indicus*) apresentam uma maior população de folículos antrais < 5 mm (SEGERSON et al., 1984). Além disso, os folículos dominantes e corpos lúteos são menores e a duração do estro é mais curta do que em fêmeas *taurus* (SARTORELLI et al., 2005; RHODES et al., 1995).

No entanto, nenhuma dessas comparações é tão relevante quanto à produção de oócitos que pode ser obtida a partir de fêmeas *Bos indicus* (Zebu). Um aspecto bastante peculiar refere-se ao fato de fêmeas *Bos indicus* serem capazes de produzir centenas de oócitos em um único procedimento de aspiração folicular. Nosso grupo obteve 251 oócitos de vaca Nelore em um único procedimento (Seneda et al., dados não publicados) e há relatos de outros grupos de até 564 oócitos por aspiração em fêmeas da mesma raça (SANTOS et al., 2005). A produção média de oócitos por sessão de aspiração folicular, entre 18 a 25 estruturas, chega a ser 3 a 4 vezes superior às médias descritas para fêmeas *taurus* (MACHADO et al., 2003; RUBIN et al., 2005; MARTIN S Jr et al., 2007). Recentemente demonstramos doadoras zebuínas produzindo regularmente mais de 60 oócitos em aspirações foliculares subsequentes (PONTES et al., 2009), sem qualquer estímulo hormonal ou sincronização do crescimento folicular.

Apesar desta intrigante peculiaridade de fêmeas zebuínas, ainda não existe uma explicação para esta diferença na fisiologia reprodutiva entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, o que certamente motiva os estudos sobre foliculogênese em fêmeas de origem indiana. Dentre as prováveis hipóteses, possivelmente a primeira a merecer investigação seja a população de folículos pré-antrais, por constituírem a reserva de gametas femininos a ser utilizada ao longo da vida reprodutiva.

Ao redor de 2 milhões de células germinativas podem ser encontradas nos ovários de fetos bovinos ao fim do primeiro trimestre de gestação, mas há um drástico declínio deste número por ocasião do último período da fase fetal ao nascimento (TANAKA, 2001), quando começa a ocorrer a ativação e o desenvolvimento folicular (NOGUEIRA et al., 2005). Dessa forma, os folículos efetivamente utilizados durante a vida reprodutiva são aqueles presentes por ocasião do nascimento do animal (SOTO-SUAZO; Zorn, 2005; Van Den HURK; ZHAO, 2005). A partir da maturidade sexual, os folículos ovarianos podem seguir dois caminhos: ovulação ou atresia. A repetição destes processos ao longo da vida pós-natal leva ao declínio progressivo do número de oócitos, à medida que a reserva de folículos pré-antrais vai sendo gradativamente consumida (EGGAN et al., 2006). Desta forma, a população dos folículos pré-antrais representa a reserva de gametas de uma fêmea, pois constituem mais de 90% de toda a população folicular ovariana (SAUMANDE, 1991; FIGUEIREDO et al., 2007).

Estudos recentes sobre a quantificação de folículos pré-antrais na espécie bovina são escassos. Um trabalho clássico cita o número de 200.000 folículos primordiais por ovário (ERICKSON, 1966). Considerando fêmeas zebuínas, estudos sobre o número total de folículos em ovários de fêmeas *Bos indicus* são ainda mais raros (LUCCI et al., 2002), tornando difícil a análise do número de folículos pré-antrais como uma possível explicação para a expressiva produção de oócitos obtidos *in vivo* de fêmeas *indicus*.

O objetivo do presente trabalho foi comparar a população folicular ovariana de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, por meio da avaliação do número de folículos pré-antrais presentes em ovários de fetos e novilhas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta dos ovários

Ovários (n=44) provenientes de fetos e novilhas foram obtidos em abatedouros locais, sendo 22 de fêmeas *Bos taurus indicus*- Nelore (fetos, n=10, 6-8 meses de gestação; e novilhas, n=12, 20-24 meses de idade) e *Bos taurus taurus*-Aberdeen Angus (fetos, n=10, 6-8 meses de gestação; e novilhas, n=12, 20-24 meses de idade). A idade dos fetos foi estimada de acordo com metodologia descrita por Salisbury e VanDemark (1961), e a idade das novilhas, segundo metodologia descrita por Faísca et al. (2002).

Imediatamente após a obtenção dos ovários, os mesmos foram lavados em álcool 70% por aproximadamente 10 segundos e então duas vezes em solução salina 0,9%. Em seguida, os ovários foram seccionados longitudinalmente em duas metades e imersos em fixador Bouin para processamento histológico.

2.2. Processamento histológico

Para analisar a estrutura dos ovários e dos folículos ovarianos, os hemi-ovários foram fixados em solução de Bouin por 24 horas. Em seguida, foram lavados em água corrente por 1 hora, pesados em balança analítica (Bel[®], Monza-Itália) e mantidos em álcool 70%. Os hemi-ovários foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e diafanizados em xilol. Em seguida, foram infiltrados e embebidos em parafina. Após a inclusão em parafina, cortes seriados de 7 μ m de espessura foram realizados em micrótomo rotativo (Leica[®], Wetzlar-Alemanha). Cada 120° secção histológica(CAHILL et al., 1979)foi montada em lâmina e corada com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina para análise estrutural em fotomicroscópio. Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo operador.

2.3. Morfometria dos folículos ovarianos

A morfometria dos folículos foi analisada através dos cortes histológicos dos ovários, classificação dos folículos pré-antrais e mensuração do diâmetro folicular. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais (uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso circundando o oócito), primários (uma camada de células da granulosa de formato cúbico envolvendo o oócito) ou secundários (oócitos envolvidos por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico; HULSHOF et al., 1994). A morfologia folicular foi avaliada de acordo com a integridade da membrana basal, a densidade celular, a presença ou ausência de corpos picnóticos e a integridade do oócito. Com base nestes parâmetros, foram considerados apenas folículos morfologicamente normais (CARAMBULA et al. 1999).

As secções foram examinadas em um microscópio de luz (Nikon®, Tokyo- Japão). Com o auxílio de uma ocular micrométrica, o diâmetro médio do oócito e do núcleo do oócito foi determinado utilizando-se dois folículos de cada classe folicular (primordial, primário e secundário) por secção avaliada.

2.4. Quantificação folicular

O número de folículos pré-antrais foi calculado sempre pela mesma pessoa, através da contagem dos folículos em cada secção, usando o núcleo do oócito como referência e o fator de correção descrito por Gougeon e Chainy (1987), usando a fórmula:

$$Nt = \frac{No \times St \times ts}{So \times do}$$

Sendo:

Nt = Número total calculado de um tipo de folículo;

No = Número de folículos observados no ovário;

St = Número total de cortes feitos no ovário;

ts = Espessura do corte;

So = Número total de cortes observados;

do = Diâmetro médio do núcleo de cada tipo de folículo.

2.5. Análise estatística

Como os dados foram considerados não-paramétricos, o número de folículos de cada classe e a comparação entre o número médio de folículos por categoria animal foram avaliados pela Análise de Variância, através do teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade. A correlação entre o peso e a quantidade de folículos pré-antrais foi avaliada pelo teste de Regressão Linear Simples.

3. RESULTADOS

Dos 44 ovários analisados, foram confeccionadas 411 secções histológicas, sendo encontrados em média 1.498 folículos por secção. Neste trabalho, não houve diferença entre o número médio de folículos pré-antrais por ovário de fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* ($p>0,05$). Foram encontrados em média 143.929 ± 253 folículos pré-antrais nos ovários de fetos *indicus*, 285.155 ± 570 em fetos *taurus*, 76.851 ± 280 em novilhas *indicus*, e 109.673 ± 293 em novilhas *taurus* (Tabela 1). Da mesma forma, também não foi observada diferença entre o número médio de folículos primordiais, primários e secundários de fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, nas categorias avaliadas ($p>0,05$; Tabela 1)

Tabela 1. Número médio de folículos pré-antrais por ovário de fetos (6-8 meses de idade gestacional) e novilhas (12-24 meses de idade) *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Aberdeen Angus).

Categoria/Raça	Número Médio de Folículos Pré-antrais por Ovário			
	Primordial	Primário	Secundário	Total
Feto <i>indicus</i> (n=10)	89.051±200 ^a	53.454±190 ^a	1.423±41 ^a	143.929±253 ^a
Feto <i>taurus</i> (n=10)	234.570±557 ^a	46.414± 133 ^a	4.172±59 ^{ab}	285.155±570 ^{ab}
Novilha <i>indicus</i> (n=12)	47.436±249 ^b	25.351±141 ^b	4.063±54 ^b	76.851±280 ^b
Novilha <i>taurus</i> (n=12)	83.726±292 ^{ab}	21.010±82 ^{ab}	4.937±86 ^{ab}	109.673±293 ^{ab}

* Letras iguais não diferem entre si, na mesma coluna, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de erro padrão.

Analisando-se a quantidade de folículos, pode-se afirmar que existe uma grande variação entre indivíduos da mesma categoria e entre as raças. A variação dentro da população amostrada de fetos Nelore esteve entre 41.957 e 248.865 folículos pré-antrais (Figura 1) e entre 50.326 e 1.090.140 para fetos Angus (Figura 2). Novilhas Nelore apresentaram variação de 9.623 a 260.371 folículos pré-antrais por ovário (Figura 3) e novilhas Angus, 33.798 a 320.729 folículos (Figura 4).

Não houve correlação entre o peso dos ovários e a quantidade de folículos pré-antrais totais por ovário nas categorias avaliadas, com exceção de fetos Angus. Os três fetos Nelore com maior população folicular (179.993, 220.602 e 248.865) apresentaram peso ovariano abaixo da média (0,36; 0,19 e 0,19g; respectivamente; Figura 1).

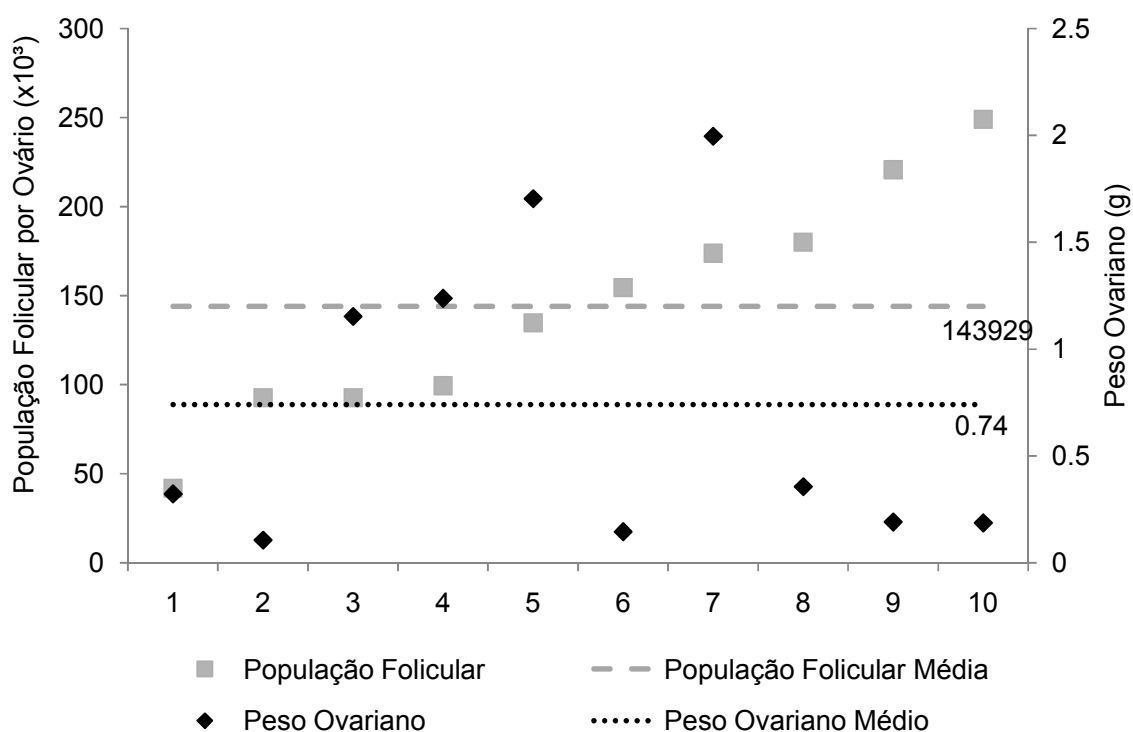


Figura 1. Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de fetos Nelore ($r=0,15$; $p>0,01$). Números de 1 a 10 representam os ovários.

Com relação a fetos Angus, houve correlação entre o peso e a quantidade de folículos pré-antrais ovarianos. Os sete ovários com peso ovariano abaixo da média apresentaram população folicular abaixo da média. Da mesma forma, os três animais com peso ovariano acima da média, apresentaram populações foliculares acima da média (Figura 2).

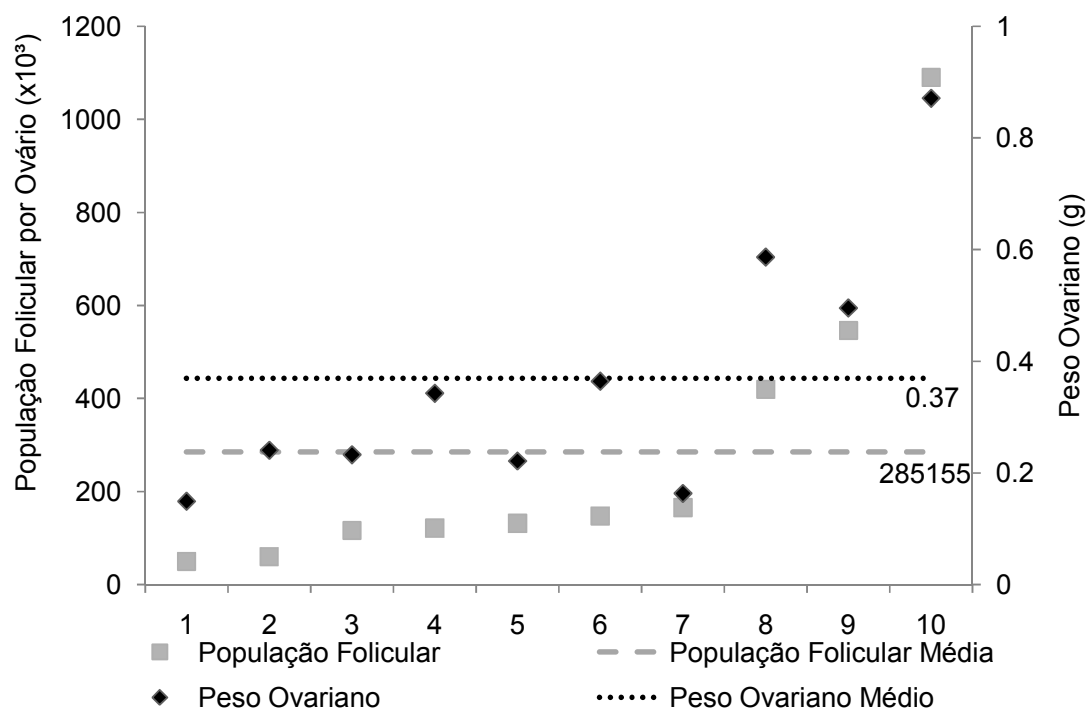


Figura 2. Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de fetos Angus ($r=0,94$; $p<0,01$). Números de 1 a 10 representam os ovários.

As duas novilhas Nelore com maior peso ovariano (6,47 e 6,78g) apresentaram população folicular abaixo da média (36.789,24 e 44.433,27; respectivamente). A fêmea com maior população folicular (260.371,06) entre as novilhas Nelore avaliadas apresentou peso ovariano abaixo da média (2,23g), como mostra a Figura 3.

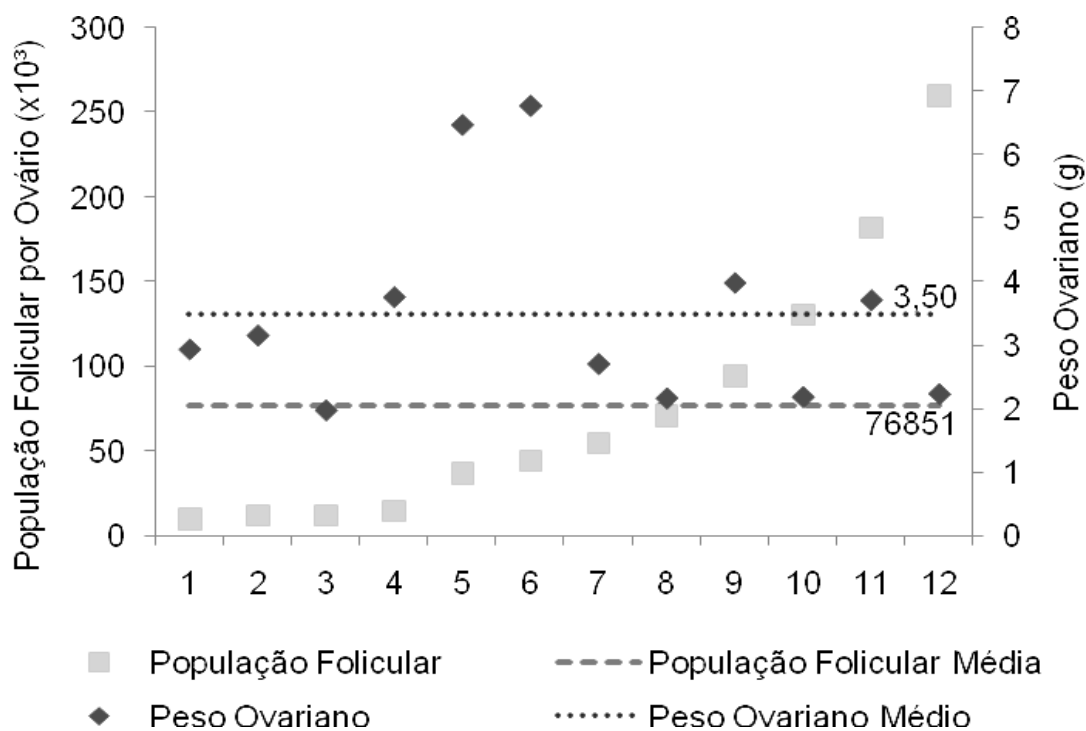


Figura 3. Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de novilhas Nelore ($r=0,24$; $p>0,01$). Números de 1 a 12 representam os ovários.

Entre as novilhas Angus avaliadas, a fêmea com maior população folicular (320.728,06) apresentou peso ovariano abaixo da média (4,84g). A novilha Angus com maior peso ovariano (9,30g) apresentou a menor população ovariana (33.797,87; Figura 4).

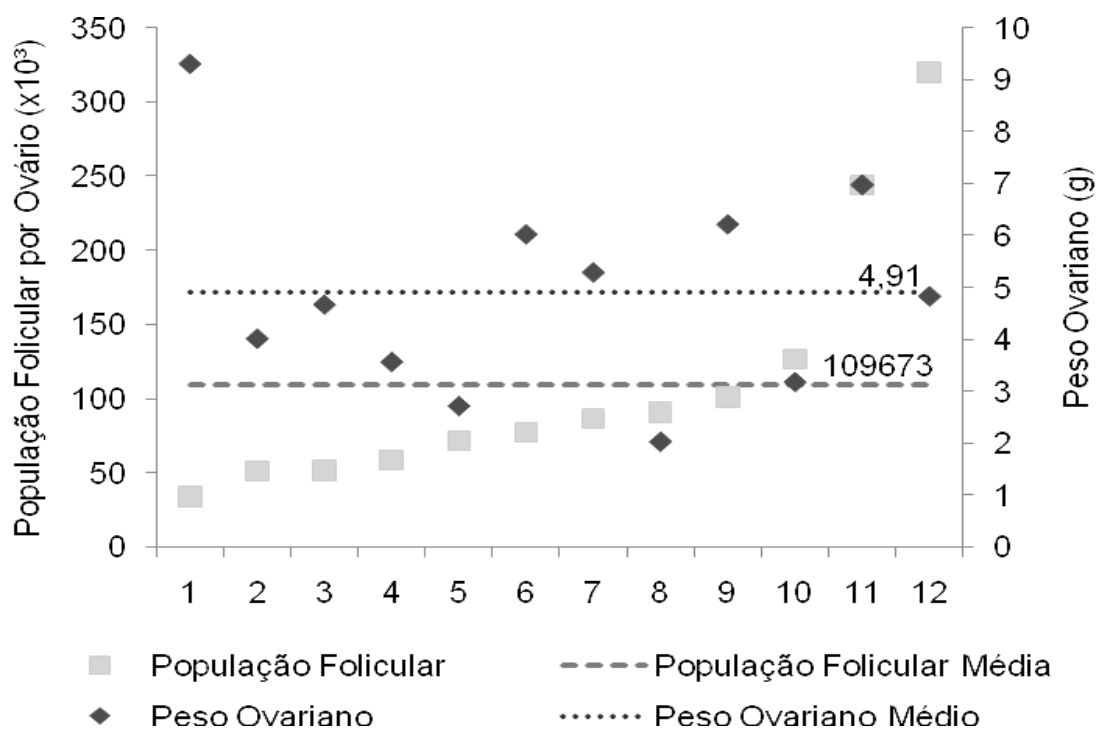


Figura 4. Número médio de folículos pré-antrais por ovário e peso ovariano de novilhas Aberdeen Angus ($r=0,14$; $p>0,01$). Números de 1 a 12 representam os ovários.

Entre os ovários avaliados, 38,6% (17/44) apresentaram folículos poliovulados (primordiais e primários). Os folículos poliovulados foram observados em ovários de fetos (n=3) e novilhas Nelore (n=3) e de fetos (n=6) e novilhas Angus (n=5). O número de oócitos dentro de um mesmo folículo variou entre dois e nove (Figura 5). Dos ovários que apresentaram folículos poliovulados, aproximadamente metade (8/17) apresentou população folicular ovariana acima da média, com valores entre 33.798 (novilha Nelore) e 1.090.140 (feto Angus) folículos pré-antrais. Também foram observados cordões celulares no ovário de duas novilhas Nelore, e no ovário de um feto e de uma novilha Angus. Aparentemente, não houve relação entre a presença dos cordões celulares e a quantidade de folículos presentes nos ovários. O número médio de folículos pré-antrais presentes nos ovários que apresentaram estas estruturas foi menor do que a média. Foram encontrados em média 36.789 e 182.189 folículos pré-antrais por ovário de novilha Nelore, 121.529 folículos em feto Angus, e 91.673 em novilha Angus (Figura 5).

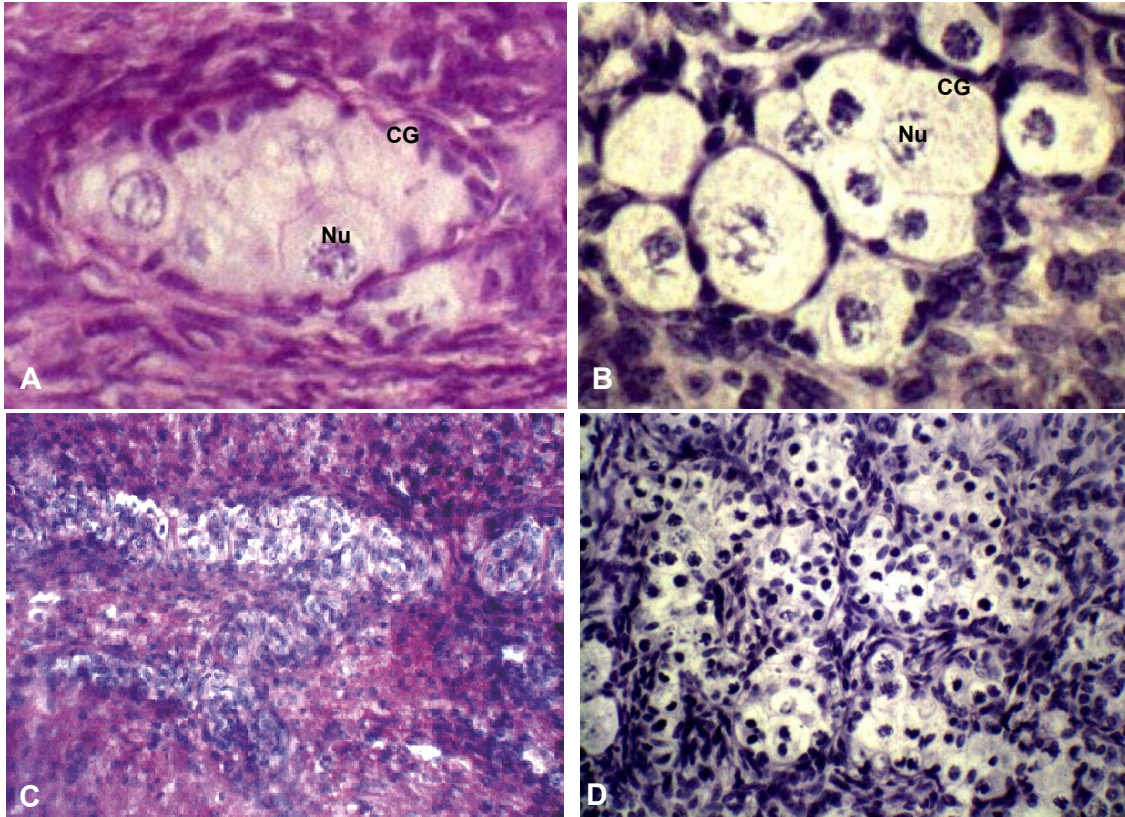


Figura 5. Secção histológica de ovário mostrando folículos poliovuados e cordões celulares. Folículos poliovuados no ovário de novilha Nelore (A) e de novilha Aberdeen Angus (B), e cordões celulares no ovário de novilha Nelore (C) e de feto Aberdeen Angus (D). Estruturas identificadas como sendo uma camada de células da granulosa (CG) envolvendo vários núcleos de oócito (Nu). Coloração PAS – Hematoxilina (400x).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, apresentamos pela primeira vez um estudo comparativo entre a população de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, considerando ovários de fetos e novilhas. Além de contribuir para uma melhor compreensão sobre quantidade e morfologia de folículos pré-antrais, demonstrou-se não haver diferença estatística entre fêmeas *indicus* e *taurus*. Assim, permanece a incógnita relativa a como fêmeas *indicus* produzem números tão superiores de oócitos na aspiração folicular, uma vez que não houve diferença na quantidade de folículos pré-antrais em fetos e novilhas.

O número médio de folículos pré-antrais encontrado em novilhas *Bos taurus taurus* (109.673) foi ligeiramente menor ao descrito por Erickson (1966) – 132.000 – obtido em 14 novilhas *taurus* (Hereford) com idade média entre 19 e 24 meses de idade, sendo este um dos trabalhos mais clássicos sobre o tema. A diferença de aproximada de 20.000 folículos pode ser considerada pequena, por tratar-se de uma avaliação de centenas de milhares de estruturas por ovário, além da diferença entre raças. Considerando a semelhança quanto ao número de animais e faixa etária dos mesmos, admitimos uma concordância quanto aos nossos resultados e os de Erickson (1966), com uma estimativa ao redor de 120.000 folículos pré-antrais como sendo representativa para novilhas taurinas até 24 meses de idade.

Em relação à população de folículos pré-antrais em vacas *Bos taurus indicus*, Lucci et al. (2002) relataram média de 70.576 folículos por ovário de vacas Nelore, número bastante próximo aos 76.851 encontrado no nosso trabalho para novilhas. Apesar de não termos obtido relato na literatura especificamente com novilhas *indicus*, a comparação de nossos dados com os desses autores sugere um número médio entre 70.000 e 75.000 para fêmeas *indicus* após os 12 meses de idade.

Não constatamos diferença estatística entre a população folicular pré-antral de novilhas *indicus* e *taurus*. No entanto, considerando os valores numéricos obtidos dos dados de Erickson (1966) e Lucci et al. (2002), parece haver uma concordância quanto a uma quantidade superior de folículos pré-antrais em novilhas *taurus* (120.000) quando comparadas com novilhas e vacas *indicus*

(70.000), um diferença estimada de 40% a menos para as fêmeas zebuínas, proporção provavelmente mantida ao longo da vida reprodutiva dos animais.

Esta diferença numérica foi encontrada também na população folicular pré-antral na fase fetal, com 285.155 estruturas para fetos *Bos taurus* e 143.929 para fetos *indicus*. Este valor para *indicus* foi bastante próximo aos 163.216 descritos para fetos Nelore com 180 dias de vida fetal (DINIZ et al., 2005). Quanto a animais taurinos, nossos resultados foram superiores aos aproximadamente 102.000 folículos descritos por Tanaka et al. (2001) para fetos da raça Holandesa ao fim da gestação. No entanto, a comparação de quantidade de folículos é bastante crítica durante a fase fetal, pois enquanto alguns autores demonstram claramente uma expressiva variação no número dessas estruturas conforme o período da gestação (TANAKA et al., 2001; DINIZ et al., 2005), outros relatos mostraram o oposto (CARAMBULA et al., 1999), particularmente após o quinto mês de gestação. Apesar desse contexto, nós obtivemos ovários de fetos entre seis e oito meses de gestação, período com menor tendência de variações na população dos folículos pré-antrais (MURANISHI et al., 2002). Dessa forma, nossos dados apontam para uma superioridade numérica de folículos pré-antrais em fetos *taurus*, mesma situação identificada em novilhas, conforme descrito acima.

Para comparação da população de folículos na espécie bovina, acreditamos ser interessante a comparação numérica e não apenas a significância estatística, pois a variação entre indivíduos é extremamente grande, dificultando a aplicação de qualquer modelo estatístico. Os relatos de variação entre animais quanto ao número de folículos compreendem extremos desde zero a 700.000 (ERICKSON, 1966) e situações semelhantes foram observadas por Tanaka et al. (2001). Em nosso experimento constatamos exatamente a mesma situação, pois os extremos para fetos foram 41.958 a 248.865 folículos (*Bos indicus*) e 50.326 e 1.090.140 folículos (*Bos taurus*). Para novilhas observamos igualmente grande variação, com população de folículos entre 9.623 e 260.371 (*Bos indicus*) e entre 33.798 e 320.729 folículos (*Bos taurus*).

Esta grande variação individual quanto ao número de folículos parece ser constante ao longo da vida reprodutiva, pois há uma alta repetibilidade no número de folículos recrutados por onda na fase adulta (BURNS et al., 2005), e a mesma observação foi efetuada na aspiração folicular para obtenção de oócitos *in vivo* (PONTES et al., 2009) Estes extremos no número de folículos pré-antrais

certamente facilitam a compreensão do fato de alguns animais produzirem centenas de oócitos em um único procedimento de aspiração folicular, tais como 251 (SENEDA et al., dados não publicado) e 564 (SANTOS et al., 2005), embora estes elevados números de oócitos *in vivo* só tenham sido relatados para animais *indicus* (PONTES et al., 2009). Para fêmeas zebuínas, recentemente demonstrou-se que a variação na produção individual de oócitos parece estar relacionada com os genes GDF9, FGF8 e BMP15 (BIASE et al., 2008). Estes autores reportaram um incremento de $2,26 \pm 1,08$ oócitos somente por efeito do gene FGF8, e um possível aumento de $7,36 \pm 1,12$ oócitos quando todos os genes foram considerados juntos. Apesar dos aspectos promissores relatados por Biase et al. (2008), admitimos que outros fatores e/ou genes possam estar envolvidos, pois as variações individuais apresentam números bastante superiores aos citados por estes autores.

Independente desta variação individual, ressaltamos que a comparação numérica dos menores e maiores valores de folículos pré-antrais, para fetos e novilhas, mostra uma superioridade absoluta dos números referentes a *Bos taurus*. Consideramos esta observação bastante interessante, pois reflete exatamente o oposto da situação observada na aspiração folicular *in vivo*, quando há uma superioridade incontestável das fêmeas *Bos indicus*, cuja produção de oócitos tende a ser quatro vezes maior do que *Bos taurus* (THIBIER, 2004; RUBIN et al., 2005, PONTES et al., 2009). De acordo com nossos resultados, o número de folículos estabelecido na fase fetal não explica esta superioridade de fêmeas *indicus* na produção *in vivo* de oócitos e provavelmente há outros mecanismos envolvidos no processo.

A constatação de fêmeas *indicus* apresentarem mais ondas foliculares (VIANA et al., 2000) e mais folículos recrutados por onda (CARVALHO et al., 2008) torna a questão mais intrigante, pois isto deveria representar maior quantidade de folículos pré-antrais, pois há uma alta regularidade no número de folículos recrutados por onda (BURNS et al., 2005). Uma possível explicação poderia ser uma taxa diferente de atresia folicular entre fêmeas *taurus* e *indicus*. Uma taxa elevada de atresia folicular naturalmente possui relação com o declínio da reserva folicular (KRYSKO et al., 2008), e talvez fêmeas *taurus* apresentem uma taxa mais elevada de atresia folicular, embora isto não tenha sido amplamente estudado.

Neste contexto, parece oportuno mencionar a hipótese de neo-foliculogênese ou renovação folicular pós-natal, apresentada recentemente por

Johnson et al. (2004 e 2005). Esses autores sugerem a diferenciação de células-tronco da medula óssea em células germinativas. Embora a controvérsia sobre a questão (EGGAN et al., 2006), o conceito de formação de oócitos viáveis a partir de células tronco já foi demonstrado por outros pesquisadores (DYCE et al., 2006).

O peso do ovário fetal normalmente está estabelecido após o sexto mês de vida fetal, pois o crescimento do estroma, multiplicação de oogônias e formação de vasos sanguíneos ocorrem antes desse período (MURANISHI et al., 2002). Em relação ao peso e quantidade de folículos pré-antrais, nossos resultados mostraram uma correlação muito baixa para animais Nelore e novilhas Angus. A literatura é escassa em vincular o peso dos ovários a folículos pré-antrais, mas em relação a folículos antrais, ovários de fêmeas *indicus* apresentaram igualmente baixa correlação entre o peso ovariano e a quantidade de oócitos produzidos (FERNANDES et al., 2001). Apesar deste contexto nas categorias mencionadas, para fetos Angus houve uma alta correlação entre o peso dos ovários e a quantidade de folículos pré-antrais ($r=0,94$; $p=0,0006$; Figura 2). É interessante notar também que fetos *taurus* apresentaram o maior número (1.090.140) de folículos de todas as categorias. Já para fetos Nelore observou-se uma grande amplitude nos valores de pesos dos ovários (Figura 1), sem qualquer relação com a população folicular. Considerando a escassez de relatos semelhantes na literatura e a complexidade dos mecanismos em atividade na gônada fetal neste período (DINIZ et al., 2005), torna-se difícil propor uma explicação para esta divergência observada entre fetos *taurus* e *indicus* e mesmo entre fetos e novilhas Angus.

Dentre os ovários de fetos e novilhas, *taurus* e *indicus*, avaliados neste trabalho, 38,6% (17/44) apresentaram as estruturas denominadas “folículos poliovulados” (LUCCI et al. 2002), ou seja, estruturas multinucleadas delimitadas por uma membrana, conforme ilustrado na Figura 5. Para a raça Nelore, tais estruturas já foram descritas em vacas, na proporção de 83% (5/6), por Lucci et al. (2002) e em fetos no primeiro trimestre de gestação, durante a oogênese, como “ninhos de oogônias” (DINIZ et al., 2005). No início da vida fetal, tais estruturas também já foram reportadas em humanos (GONDOS et al., 1971) e sob a denominação de “cistos” (PEPLING et al., 2006). Enquanto as células germinativas estão se dividindo para formar os “cistos” ou “ninhos”, ocorre interação das mesmas com células da pré-granulosa, originando cordões ovarianos, os quais são mantidos até a formação dos folículos primordiais (ODOR; BLANDAU, 1969; BYSKOV, 1986; HIRSHFIEL, 1991;

GUIGON; MAGRE, 2006). Desta forma, é fato intrigante a observação de tais estruturas na fase fetal tardia e, principalmente, em novilhas, como constatado neste trabalho para fêmeas *taurus* e *indicus*, e em vacas *indicus*, conforme relatado por Lucci et al. (2002).

Além dos folículos poliovulados, também observamos em novilhas Nelore e fetos e novilhas Angus, a ocorrência de cordões celulares semelhantes aos cordões foliculares (Figura 5), descritos para a organização das células germinativas com as células da pré-granulosa em cordões ovarianos. A literatura relata tal ocorrência apenas na primeira parte da vida fetal (DINIZ et al., 2005), e desconhecemos possíveis explicações para este achado. Tanto os folículos poliovulados quanto os cordões celulares encontrados neste trabalho poderiam ser sugestivos de alguma atividade de renovação folicular, uma vez que estas estruturas são típicas do início da foliculogênese. Mas certamente métodos mais precisos são necessários para investigações desta natureza. É interessante notar que, aparentemente, não houve qualquer relação entre a presença destas estruturas e a quantidade de folículos ovarianos pré-antrais, confirmando a necessidade de mais estudos sobre este achado.

Concluindo, nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre a população de folículos pré-antrais de fetos e novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus*. Assim, admitimos que deve haver outra diferença entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, que não seja a população de folículos pré-antrais, para justificar a diferença encontrada na produção de oócitos. Identificamos ainda uma expressiva variação individual na quantidade de folículos pré-antrais entre todas as categorias estudadas. Finalmente, relatamos a ocorrência de aglomerados atípicos de folículos, em forma de ninhos e cordões, os quais são classicamente citados durante o início da fase fetal.

REFERÊNCIAS

BIASE, F.H., FONSECA, M.G.K., FREITAS, S.B.W.K., MARTELLI, L., MEIRELLES, F.V. Global poly(A) mRNA expression profile measured in individual bovine oocytes and cleavage embryos. **Zygote**, v.16, n.1, p.29-38, 2008.

BURNS, D.S., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53-62, 2005.

BYSKOV, A.G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. **Physiological Reviews**, v.66, p.71-117, 1986.

CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.27-36, 1979.

CARÁMBULA, S.F., GONALVES, P.B.D., COSTA, L.F.S., FIGUEIREDO, J. R., WHEELER, M.B., NEVES, J.P., MONDADORI, R.G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, v.52, p.563-571, 1999.

CARVALHO, J.B.P., CARVALHO, N.A.T., REIS, E.L., NICHÍ, M., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-175, 2008.

DINIZ, E.G., ESPER, C.R., JACOMINI, J.O., VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p.70-76, 2005.

DYCE, P.W., LIHUA, W., LI, J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. **Nature Cell Biology**, v.8, p.384-390, 2006.

EGGAN, K., JURGA, S., GOSDEN, R., MIN, I.M., WAGERS, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. **Nature**, v.441, p.1109-1114, 2006.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

FAÍSCA, J.C., ALEXANDRE-PIRES, G., MENDES-JORGE, L. Elementos para a diagnose do sexo e idade em carcaças de bovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.543, p.111-118, 2002.

FERNANDES, C.E., DODE, M.A.N., GODOY, K., RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p.131-135, 2001.

FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLE, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FIGUEIREDO, J.R., CELESTINO, J.J.H., RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.143-152, 2007.

GONDOS, B., BHURALEUS, P., HABEL, C.J. Ultrastructure observations on germ cells in human fetal ovaries. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.110, p.644-652, 1971.

GOUGEON, A., CHAINY, G.B.N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.433-442, 1987.

GUIGON, C.J., MAGRE, S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: Insights from models of germ cell depletion. **Biology of Reproduction**, v.74, p.450-458, 2006.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, v.124, p.43-101, 1991.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, n.2, p.78-80, 1994.

JOHNSON, J., BAGLEY, J., SKAZNIK-WIKIEL, M., LEE, H.J., ADAMS, G.B., NIKURA, Y., TSCHUDY, K.S., TILLY, J.C., CORTES, M.L., EORKERT, R., SPITZER, T., IACOMINI, J., SCADDEN, D.T., TILLY, J.L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral. **Cell**, v.122, p.303-315, 2005.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J.K., TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150, 2004.

KRYSKO, D.V., DIEZ-FRAILE, A., CRIEL, G., SVISTUNOV A.A., VANDENABEELE, P., D'HERDE, K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis**, v.13, p.1065-1087, 2008.

LUCCI, C.M., RUMPF, R., FIGUEIREDO, J.R., BÃO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.57, p.1467–1483, 2002.

MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPPERT, M., MATOS, L.F., WOLF, E., GONÇALVES, P.B.D. Variabilidade da punção folicular transvaginal e da produção *in vitro* de embriões em vacas gêmeas monozigóticas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.442-443, 2003 (Resumo).

MARTINS JR., A., TAKADA, L., ABRAHÃO, R.G., FREITAS, C.P., CALEGARI, R.S. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1194-1194, 2007 (Resumo).

MURANISHI, Y., ACOSTA, T.J., MIYAMOTO, A., FUKUI, Y. Changes in the number of preantral follicles and hormone concentrations in the bovine fetus. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, n.6, 2002.

NOGUEIRA, G.P., MARCASSA, G.P.S.D., BELTRAN, M.P. Variação na concentração de gonadotrofinas e na população de folículos durante o desenvolvimento fetal em *Bos taurus indicus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, v.16, 2005, Goiânia. **Anais...Goiânia**, 2005. p.1 (Resumo).

ODOR, D.L., BLANDAU, R.J. Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis. **American Journal Anatomy**, v.124, p.163–186, 1969.

PEPLING, M.E. From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development. **Genesis**, v.44, p.622–632, 2006.

PONTES, J.H.F., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B.V., ERENO-JUNIOR, J.C., UVO, S., BARREIROS, T.R.R., OLIVEIRA, J.A., HASLER, J.F., SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, n.4, p.690-697, 2009.

RHODES, F.M., DE'ATH, G., ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-277, 1995.

RUBIN, K.C.P., PONTES, J.H.F., NONATO JR., ERENO JR, J.C., PANSARD, H., SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005.

SALISBURY, G.W., VANDEMARK, N.L. Gestation. In: SALISBURY, G.W., VANDEMARK, N.L. (eds). **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle**. San Francisco and London: W.H. Feeman & Company, 1961. p.121-125.

SANTOS, R.G., SOTO, M.A.B., LOURENÇO, R.X., STRANIERI, P., BISHOP, W., ACCORSI, M.F., WATANABE, M.R., DAYAN, A., WATANABE, Y.F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.16, p.79, 2005.

SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J., BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SAUMANDE J. La Folliculogenèse Chez les Ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.167, p.205-218, 1991.

SEGERSON, E.C., HANSEN, T.R., LIBBY, D.W., RANDEL, R.D., GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.59, p.1026-46, 1984.

SOTO-SUAZO, M., ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction Science**, v.3, p.147-160, 2005.

TANAKA, Y., NAKADA, K., MORIYOSHI, M., SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p.777-782, 2001.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, p.12-19, 2004.

THIBIER, M. New records in the numbers of both *in vivo*-derived and *in vitro*-produced bovine embryos around the world in 2006. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v.25, p.15-20, 2007.

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

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501-2509, 2000.

6 DISCUSSÃO GERAL

Apesar de já ter sido amplamente estudada, a foliculogênese ainda apresenta muitos aspectos a ser esclarecidos. Sabe-se que os folículos ovarianos pré-antrais representam a maior parte da população folicular ovariana e que são responsáveis pela renovação dos folículos antrais. Entretanto, apesar da importância dos folículos pré-antrais na foliculogênese, existem ainda muitas dúvidas sobre os mecanismos de ativação e o desenvolvimento dos mesmos.

A partir da maior difusão da produção *in vitro* de embriões, descobriu-se um aspecto bastante peculiar de fêmeas zebuínas, a elevada produção de oócitos obtida *in vivo* naturalmente a partir de fêmeas *Bos indicus*, quando comparada com fêmeas *Bos taurus*. Entretanto, ainda não existe uma explicação para esta diferença na fisiologia reprodutiva entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, o que certamente motiva os estudos sobre foliculogênese em fêmeas zebuínas.

Novas teorias têm sido propostas sobre a origem e o desenvolvimento dos gametas femininos. A possibilidade de formação contínua de folículos e oócitos apresenta-se como hipótese extremamente interessante e a hipótese da diferenciação das células-tronco em oócitos por mecanismos epigenéticos parece ser bastante promissora. Estas evidências sugerem algo novo no campo do conhecimento fundamental da foliculogênese, certamente com reflexos aplicados na MOIFOPA, TE, FIV, IATF, e em todo segmento da reprodução.

Uma comparação entre a produção de oócitos de fêmeas *Bos taurus*, *Bos indicus* e produtos do cruzamento *taurus-indicus* foi apresentada no Artigo 2. O melhoramento genético e o cruzamento racial têm sido utilizados como ferramentas auxiliares na obtenção *in vivo* de oócitos e na produção *in vitro* de embriões. Diversos trabalhos já apresentaram informações sobre a produção de oócitos a partir de fêmeas *Bos indicus*, *Bos taurus* e produtos do cruzamento *taurus-indicus*. Analisando-se estes trabalhos, dois aspectos chamaram-nos a atenção, por ocorrer na quase totalidade dos trabalhos compilados. Comparações entre diferentes raças e entre raças e cruzamentos raciais são raras. Além disso, o número de aspirações foliculares apresentados nos trabalhos da literatura é relativamente baixo. Por essas informações, apresentamos dados de um número expressivo de aspirações foliculares e comparamos a produção de oócitos entre *taurus*, *indicus* e

produtos do cruzamento *taurus-indicus*. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a produção de oócitos de fêmeas *Bos indicus* foi maior em relação a *Bos taurus*. Os produtos do cruzamento *taurus-indicus* apresentaram a maior produção de oócitos em relação a fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*. Entretanto, com o aumento do grau de sangue *Bos taurus*, a produção de oócitos apresentou-se menor.

O Artigo 3 trouxe uma contribuição significativa aos resultados obtidos no artigo anterior. Diversos trabalhos foram conduzidos com o objetivo de aumentar a eficiência na recuperação de oócitos por aspiração folicular. Dessa forma, existem diversos trabalhos na literatura sobre o desenvolvimento de folículos antrais. Entretanto, existem poucas informações sobre o desenvolvimento dos folículos pré-antrais, responsáveis pela renovação de folículos antrais ovarianos. Os dados de literatura apontam para uma superioridade de fêmeas *Bos indicus* em número de oócitos produzidos *in vivo* em relação a fêmeas *Bos taurus*. Considerando-se que 99,9% dos folículos sofrem atresia, seria difícil explicar esta alta produção de oócitos obtidos sem uma correspondente maior população de folículos pré-antrais. A partir destas informações, apresentamos neste trabalho uma comparação entre a população de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*. Os resultados obtidos mostraram que as populações foliculares de fetos e novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* foram semelhantes. O número de folículos pré-antrais por ovário apresentou uma grande variação entre indivíduos da mesma categoria e entre as raças analisadas. Dessa forma, existem animais que apresentaram uma grande quantidade de folículos pré-antrais por ovário e outros com populações foliculares abaixo da média. Dada a importância dos folículos pré-antrais no processo de foliculogênese, e também na produção *in vitro* de embriões, consideramos que os resultados obtidos vão contribuir para a elucidação de aspectos ainda obscuros.

Finalizando, estamos convictos de que os resultados obtidos neste trabalho constituem mais um passo rumo ao avanço e compreensão dos eventos implicados na foliculogênese. Deve haver alguma diferença entre fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*, excluindo-se a população folicular ovariana, que justifique a alta produção de oócitos obtidos naturalmente de fêmeas *Bos indicus*.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- As novas teorias propostas sobre a origem e o desenvolvimento dos gametas femininos sugerem algo novo, entretanto, mais investigações são necessárias para confirmar sua existência ou refutá-las definitivamente;
- A produção de oócitos obtidos *in vivo* de fêmeas *Bos taurus indicus* foi maior em relação a *Bos taurus taurus*. Entretanto, os produtos do cruzamento $1/2$ *taurus*- $1/2$ *indicus* apresentaram a maior produção de oócitos, e o maior grau de sangue *taurus* proporcionou uma redução na produção de oócitos obtidos de $3/4$ *taurus*- $1/4$ *indicus*;
- Fetos e novilhas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* apresentaram população folicular ovariana semelhante. A população de folículos pré-antrais apresentou uma grande variação entre indivíduos da mesma categoria e entre as raças analisadas. Houve uma baixa correlação entre a população folicular e o peso ovariano, exceto para fetos *Bos taurus*, cuja correlação foi alta;
- A investigação da população de folículos pré-antrais ovarianos não foi suficiente para explicar a maior produção de oócitos obtidos *in vivo* a partir de fêmeas *Bos taurus indicus* em relação a *Bos taurus taurus*.