

Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)

Isolation and ultrastructural characterization of preantral follicles in the Nelore breed cows (*Bos taurus indicus*)

Andréa Cristina BASSO²; Cesar Roberto ESPER¹

Correspondência para:
CÉSAR ROBERTO ESPER
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias de Jaboticabal da UNESP,
Via de Acesso Paulo D. Castellani, s/n
14884-900 – Jaboticabal, SP
e-mail: bassoac@fcav.unesp.br

1- Departamento de Reprodução Animal
da Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias de Jaboticabal UNESP,
Jaboticabal - SP
2- Departamento de Reprodução Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP, São Paulo - SP

RESUMO

Folículos pré-antrais de 41 vacas da raça Nelore foram quantitativa e ultraestruturalmente descritos neste estudo. Uma média de 35.539,20 folículos pré-antrais foram isolados mecanicamente (“Tissue Chopper”) por animal. Os folículos foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. Os folículos primordiais apresentaram um oócito rodeado por uma camada de células granulosas (CGs) achatadas, com algumas tendendo à forma cuboidal. As demais fases de desenvolvimento foram classificadas como folículos primários, com uma camada de CGs cuboidais, e secundários, com mais de duas camadas de CGs cuboidais. Os folículos primordiais apresentaram oócito evidente, com núcleo excêntrico e nucléolo bem definido, cercado por regiões de cromatina condensada. As organelas ao redor do núcleo eram, predominantemente, mitocôndrias arredondadas. Folículos em desenvolvimento apresentavam organelas mais dispersas e numerosas, com mitocôndrias alongadas. As comunicações entre o oócito e as CGs mantinham-se por zonas de aderência, “coated pits” e vesículas de endocitose. A zona pelúcida (ZP) começava a aparecer em folículos primários, mostrando microvilos pequenos e vesículas penetrando na ZP. Os folículos secundários apresentavam aglomerados de grânulos corticais em associação a complexos de Golgi. Concluímos que o método mecânico de isolamento fornece quantidades suficientes de folículos pré-antrais de ovários de vacas da raça Nelore e, pela semelhança ultraestrutural com os folículos de outras raças, é possível a utilização dos mesmos protocolos de cultivo que vêm sendo estudados, desde que possibilitem a maturação meiótica dos oócitos.

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos. Folículos Pré-antrais. Isolamento. Ultraestrutura.

INTRODUÇÃO

Os procedimentos de maturação e fertilização *in vitro* de oócitos têm progredido significativamente nas últimas décadas, resultando no desenvolvimento de técnicas de superovulação e produção de embriões a partir de oócitos de folículos antrais. O fato de uma bezerra ter centenas de milhares de oócitos ao nascimento (Russe³¹; Gordon¹⁵) e, somente uma ínfima parte atingir a maturação meiótica durante a vida produtiva³⁴, limita o número de nascimentos, bem como a exploração do material genético de cada animal. A manipulação *in vitro* de oócitos recuperados da população de folículos ovarianos pré-antrais, além de servir de modelo nas investigações sobre os complexos mecanismos da foliculogênese inicial, tem um grande impacto na reprodução assistida de espécies em extinção. As possibilidades do emprego dos folículos pré-antrais em sistemas de crescimento, maturação e fecundação *in vitro* abre um leque de novas alternativas para a seleção e

melhoramento genético animal^{11,33}.

O desenvolvimento folicular e foliculogênese têm requerido atenção de diversos autores, tanto sob o aspecto básico como aplicado^{11,16,24,27,37,38}. Entretanto, a evolução destas pesquisas requer um completo entendimento da biologia celular na fase de desenvolvimento do folículo, como também o estabelecimento de sistemas eficientes de isolamento e cultivo *in vitro* que suportem o crescimento folicular até o estágio de maturação meiótica. Ainda são desconhecidos os fatores que determinam a origem do crescimento folicular, bem como a diferenciação e acúmulo de organelas citoplasmáticas e a seleção de alguns folículos primordiais, enquanto outros permanecem bloqueados^{13,21}.

Diferentes metodologias de isolamento têm sido aplicadas para obtenção de folículos pré-antrais isolados, sendo a dissociação mecânica^{5,18}, a digestão proteolítica pelo uso de enzimas¹⁴ ou, o isolamento mecânico em combinação com dissociação enzimática parcial^{11,29} as mais utilizadas. Devido à grande quantidade de matriz fibrosa existente no tecido ovariano de animais domésticos adultos

e ao efeito prejudicial das enzimas sobre a qualidade do folículo isolado³³, porções de tecido ovariano têm sido processadas no “Tissue Chopper”, seguido de sucessivas pipetagens¹².

Os procedimentos de colheita, isolamento e manipulação folicular são prejudiciais para a viabilidade do folículo e do oócito nele incluso nos posteriores estádios de experimentação. Uma forma de avaliar a viabilidade do oócito e das células foliculares seria pela análise morfológica e ultraestrutural, bem como por técnicas de coloração específicas, associadas à histologia clássica¹⁵. No entanto, poucos estudos retratam a viabilidade ultraestrutural de oócitos e células foliculares após procedimentos de isolamento e manipulação *in vitro*. Foi determinado que a fase de crescimento do oócito mamífero inicia-se durante o bloqueio meiótico em prófase da primeira divisão meiótica, sendo caracterizada por uma substancial atividade sintética de proteínas e RNA¹⁰. O crescimento do oócito também foi caracterizado pela entrada de proteínas, lipídios e carboidratos por endocitoses ou por conexões citoplasmáticas com as CGs¹. A proliferação das CGs e a síntese de DNA podem ser detectadas por técnicas de incorporação de Timidina triciada²⁸ ou Bromo-dióxido-uridina (BrdU)¹⁹ no meio de cultivo. Os estudos morfológicos utilizando microscopia eletrônica têm sido muito aplicados na avaliação do desenvolvimento e na análise da viabilidade de folículos pré-antrais *in vitro*, em diferentes espécies de mamíferos, sendo indispensáveis para identificar oócitos intactos e determinar a qualidade das CGs^{8,25}. O número de organelas e inclusões aumenta com o crescimento folicular e sofrem deslocamento pelo oolema²⁰. Por outro lado, estruturas específicas do oócito, como grânulos corticais, mitocôndrias “hooded” e zona pelúcida, têm sido encontradas apenas a partir do estágio de folículo secundário⁸.

O *pool* de folículos pré-antrais existente nos ovários de mamíferos representa uma significativa reserva de material para estudos com a manipulação genética de espécies domésticas, bem como para a preservação de espécies em extinção e tratamento de algumas formas de infertilidade, principalmente ao nível de pesquisa³⁰. Levando-se em consideração o fato de bovinos da raça Nelore serem predominantes entre as raças de corte no Brasil³² e a escassez de estudos sobre sua foliculogênese na fase pré-antral, seriam importantes e justificados, estudos visando o melhor conhecimento da fisiologia reprodutiva desta raça de zebuínos. Assim sendo, foi objetivo deste trabalho, avaliar numérica e comparativamente folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore, bem como pesquisar características morfológicas e ultraestruturais durante as diferentes fases do desenvolvimento folicular.

MATERIALE MÉTODO

Colheita dos ovários

Ovários de vacas da raça Nelore foram colhidos em abatedouros e lavados e armazenados individualmente em 100 ml de PBS (Gibco BRL, Life Technologies BV, Breda, The Netherlands) suplementado com 200 UI/ml de Penicilina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e 200 mg/ml de Estreptomicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), a uma temperatura de 4°C e suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (FCS) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Os ovários eram acondicionados em recipiente térmico, com água e gelo a 4°C para serem transportados para o laboratório em um período de tempo que não ultrapassava 1 hora.

Isolamento folicular

Os ovários foram processados no “Tissue Chopper” (The Mickle Laboratory Engineering CO, Gomshal, Surrey, England), ajustado para cortes de 750 µm. Os cortes eram realizados nos eixos longitudinais, transversais e oblíquos, da região externa para a interna do córtex ovariano. Os fragmentos eram transferidos para PBS com 5% de FCS, na proporção de 1 volume de tecido:10 volumes de meio. Em seguida, as soluções de fragmentos eram suspensas por repetidos movimentos de sucção com pipeta de Pasteur de 1000 µm de diâmetro e, posteriormente, com uma pipeta de menor calibre (600 µm). Se necessário, os fragmentos de tecido em dimensões excessivas voltavam para o cortador e o processo era repetido. O passo seguinte consistia da filtração sucessiva da suspensão em malha de nylon de 500 e 100 µm. Os folículos eram avaliados e estimados quanto ao número sob microscópio de inversão (FLUOVERT, LEITZ, GERMANY) e separados do material contaminante (células do estroma folicular) com auxílio de micropipeta. Posteriormente, o *pool* de folículos foi processado para microscopia eletrônica de transmissão de acordo com a técnica descrita por Esper⁷, modificada para folículos pré-antrais isolados como no estudo realizado por Jewgenow; Stolte²².

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Inicialmente, folículos isolados bem como pequenos fragmentos de tecido ovariano eram fixados em Glutaraldeído a 3%, em tampão Cacodilato de sódio 0,25 M, pH = 7,4, durante 2 horas. Após a remoção do fixador por duas a três lavagens no mesmo tampão, “pellet” contendo a suspensão de folículos isolados era incluso em 1 ml de gelatina purificada (10%) (Gelatin Purified Powder, 60 Bloom, Type A, from Porcine Skin - TED PELLA). Cada bloco de gelatina, ou fragmento de tecido ovariano, era pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão Cacodilato 0,2 M, por 2 horas em

temperatura de 4°C e, posteriormente, desidratados por 10 minutos em séries crescentes (30, 50, 70, 90 e 95) de etanol, seguidos de 3 banhos de 20 minutos cada em etanol absoluto. A desidratação era finalizada com uma última passagem em óxido de propileno (OP) por 2 a 3 minutos. Os blocos passavam então para o processo de inclusão em Resina Epon-812. Secções semi-finas (0,5 mm) eram obtidas, primeiramente, com navalhas de vidro em ultramicrotomo (Reichert OM-U2, Áustria) para uma seleção prévia das secções e, na seqüência, eram realizados os cortes ultrafinos (60 a 70 nm). As secções ultrafinas, obtidas com navalhas de diamante, eram colhidas em grades de cobre (malha 200), coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão (JEOL-EM-1010, JAPAN). Foram obtidas diferentes eletromicrografias dos folículos, sendo avaliados quanto ao aspecto ultraestrutural de suas organelas.

RESULTADOS

Análise quantitativa dos folículos pré-antrais

Foram analisados 41 pares de ovários de vacas da raça Nelore. O método mecânico de isolamento folicular com a utilização do “Tissue Chopper” mostrou alta eficiência no isolamento de folículos pré-antrais a partir dos ovários processados, obtendo-se uma média não transformada de 35.539,20 folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) isolados por animal.

Análise ultraestrutural dos folículos pré-antrais

Neste experimento, os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com as seguintes categorias: folículos primordiais (oócitos rodeados por uma camada de CGs achatadas ou achatadas e cuboidais); folículos primários (oócito rodeado por uma camada simples de CGs cuboidais); e folículos secundários (oócito rodeado por duas ou mais camadas de CGs cuboidais).

Folículos primordiais

A análise ultraestrutural dos folículos primordiais de vacas mostrou folículos ativados, com modificações ultraestruturais indicativas de início de desenvolvimento. O folículo primordial era caracterizado por um oócito esférico ou ovóide, completamente rodeado por uma camada simples de CGs achatadas, sendo que algumas tendiam à forma cuboidal (Fig. 1). A membrana ovocitária mantinha estreito contato com a membrana das CGs, mostrando regiões semelhantes a zonas de aderência (Fig. 2), além da presença de projeções que penetravam por entre as células adjacentes. Foram observados alguns microvilos paralelos à superfície do oócito, direcionados ao citoplasma

das células adjacentes (Fig. 4). O núcleo do oócito era grande e ocupava uma posição excêntrica no oolema. O nucléolo aparecia bem definido, enquanto que as organelas estavam dispostas em aglomerados, principalmente ao redor do núcleo (Fig. 1). As mitocôndrias eram bem evidentes e apresentavam formato esférico com cristas periféricas e paralelas à membrana externa, muitas delas apresentavam um ou dois grânulos densos (Fig. 1). As demais organelas como gotas de lipídeos e retículos endoplasmáticos apresentavam-se em número reduzido pelo oolema. Pequenos complexos de Golgi foram visualizados na região ao redor do núcleo (Fig. 8) e não foram encontrados sinais de formação de ZP neste estágio de desenvolvimento folicular. Os núcleos dos oócitos de folículos primordiais mostraram-se granulares e eram semelhantes a uma “rede” caracterizada pela presença de grânulos de eletrodensidade homogênea e pequenos vacúolos. O nucléolo era distinto com vacúolos que variavam em tamanho e número (Fig. 1), acompanhado por regiões de cromatina condensada que se estendiam pelo nucleolema. As CGs achatadas apresentavam núcleo grande (Fig. 1) e continham poucas organelas com predominância de mitocôndrias que, por sua vez, apresentavam-se de forma arredondada ou alongada e com cristas transversais bem características. O nucléolo geralmente era aparente.

Folículos primários

Os folículos primários eram caracterizados por um oócito esférico com uma camada simples de CGs de formato cuboidal (Fig. 3). As comunicações entre as CGs e o oócito eram aparentemente mantidas por endocitoses, caracterizadas por uma grande quantidade de vesículas revestidas por membrana plasmática (Fig. 4). O citoplasma do oócito apresentava projeções que penetravam por entre as CGs adjacentes formando microvilos paralelos à superfície do oócito, como nos folículos primordiais, mas mais freqüentes. As mitocôndrias estavam espalhadas por todo o ooplasma e em número bastante aumentado (Fig. 3). Ainda prevalecia o formato arredondado, porém muitas delas já se mostravam alongadas com cristas transversais e em processo de divisão. As demais organelas apresentavam-se um pouco mais dispersas pelo citoplasma. Gotas de lipídeos, complexos de Golgi e retículos endoplasmáticos eram mais freqüentes e se localizavam mais próximos à membrana nuclear (Figs. 7 e 8). Em algumas regiões havia início de formação de zona pelúcida (Fig. 5). Os núcleos de folículos primários eram caracterizados por uma “rede” preenchida por grânulos distintos mais característicos que no folículo primordial. Outros grânulos dispersos e massas fibrilares apareciam ao longo da superfície nucleolar ou associados à cromatina condensada. As mitocôndrias das CGs cuboidais eram alongadas com cristas longitudinais.

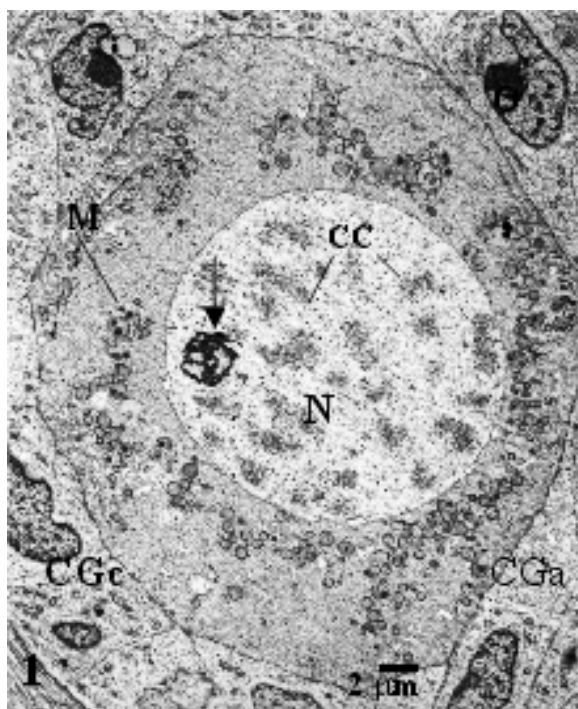


Figura 1

Eletromicrografia mostrando um folículo primordial de vaca. Notar as células granulosas achatadas (CGa) e cuboidais (CGc) ao redor do oócito (O), núcleo (N) com nucléolo bem definido (seta) e regiões de cromatina condensada (CC). Mitocôndrias arredondadas (M) estão aglomeradas ao redor do núcleo 4.250X.

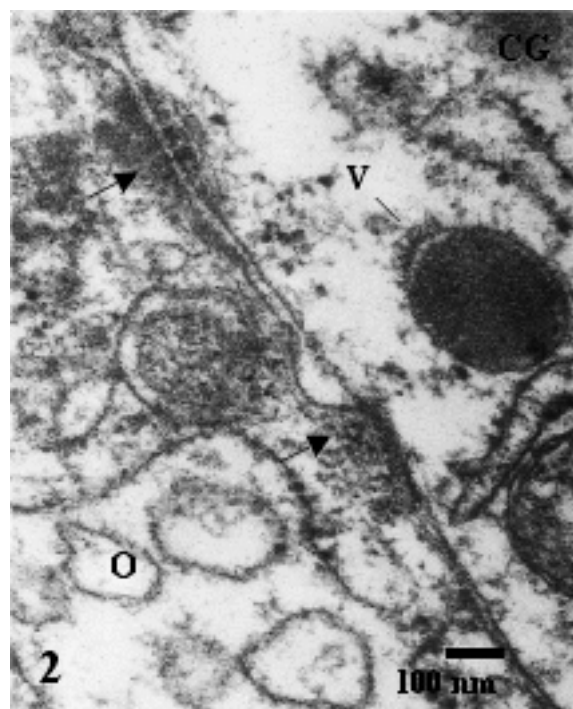


Figura 2

Eletromicrografia mostrando um detalhe de um folículo primordial ativado de vaca. São visualizadas zonas de aderência (setas) entre o oócito (O) e as células granulosas adjacentes (CG), bem como vesículas de secreção (V) próximas à membrana da célula granulosa. 72.000 X.

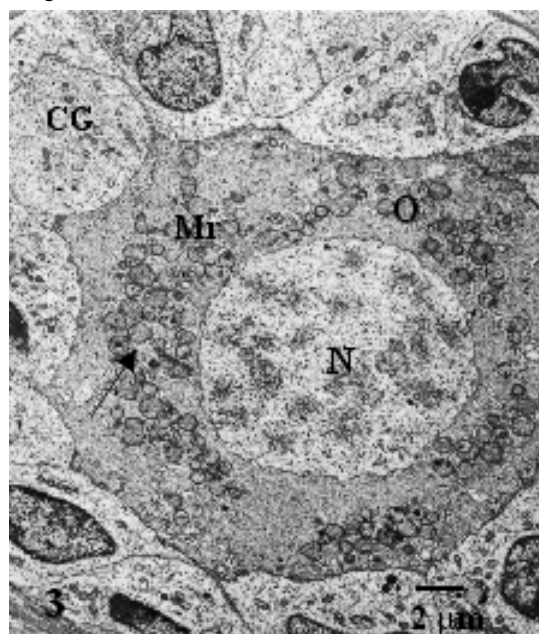


Figura 3

Eletromicrografia de um detalhe de um folículo primário de vaca. Notando uma camada de células granulosas cuboidais (CG) ao redor do oócito (O). Podem ser vistas Mitocôndrias redondas (Mr) aglomeradas no citoplasma do oócito, muitas contendo um grânulo eletro-denso (Gr) e poucas onículas. 5.100 X

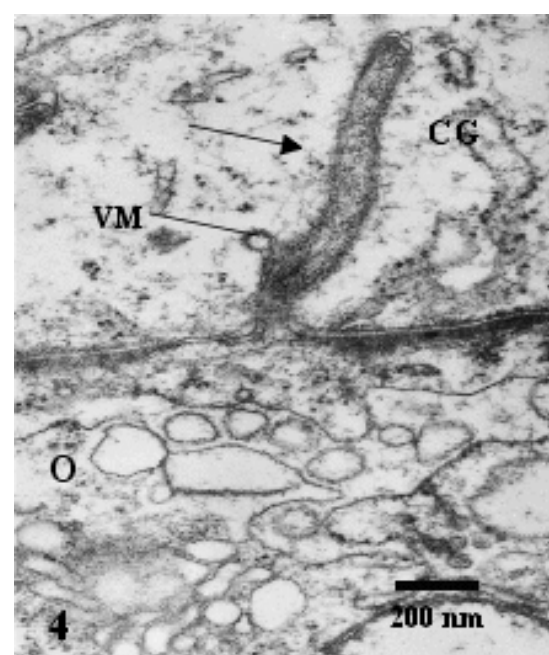


Figura 4

Eletromicrografia mostrando um detalhe do microvilos (seta) do oócito (O) em um folículo primário de vaca, penetrando na célula granulosa (CG). Nota-se uma vesícula formada por membrana (VM) ou "Coated Pit". 30.000 X.

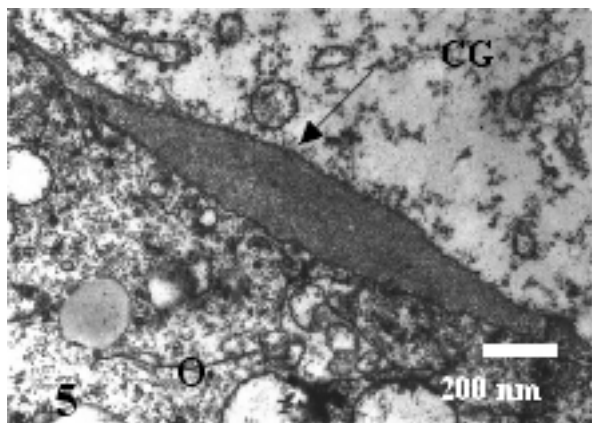


Figura 5

Eletromicrografia mostrando um detalhe do início da formação da zona pelúcida (seta) no folículo primário de vaca, entre o oócito (O) e a célula granulosa (CG). 18.000 X.

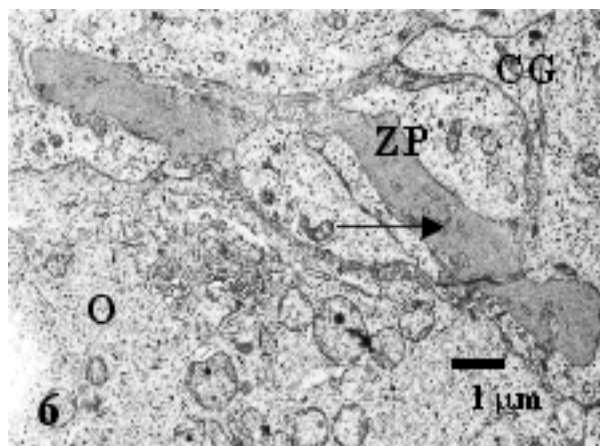


Figura 6

Eletromicrografia mostrando um detalhe do início da formação da zona pelúcida (ZP) no folículo secundário de vaca, com pequenos microvilos (seta), entre o oócito (O) e a célula granulosa (CG). 10.2000 X.

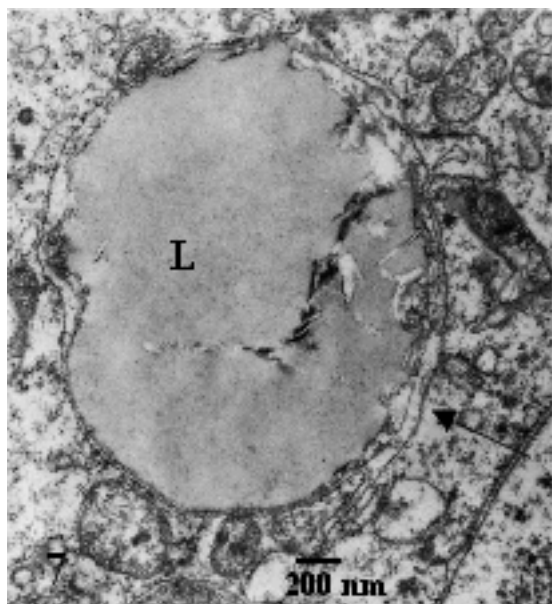


Figura 7

Eletromicrografia mostrando um detalhe de uma gota de lipídeo (L) em um folículo secundário de vaca, envolta por retículo endoplasmático liso (seta). 24.000 X.

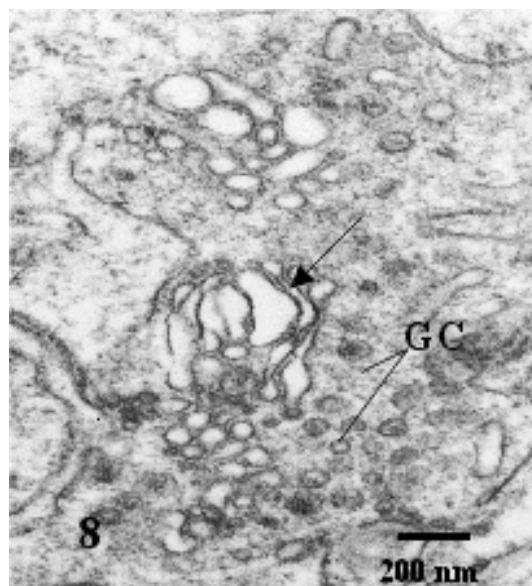


Figura 8

Eletromicrografia mostrando um detalhe de um complexo de Golgi (seta), em um folículo secundário de vaca, em associação a grânulos corticais (GC). 51.000 X.

Folículos secundários

Os folículos secundários apresentavam duas ou mais camadas de CGs de forma cuboidal. Em alguns casos, a ZP começava a se formar em torno do oócito, em associação com os microvilos (Figs. 1 e 6). As organelas estavam espalhadas por todo o ooplasma. Neste estágio de desenvolvimento, havia prevalência de mitocôndrias alongadas espalhadas por todo o oolema. Gotas de lipídeos e outras vesículas citoplasmáticas

tornavam-se mais freqüentes. As regiões de acúmulo de ZP apresentavam microvilos curtos (Fig. 6). As mitocôndrias alongadas estavam em maior número e todos os oócitos apresentavam aglomerados de grânulos corticais ao longo do citoplasma. Os núcleos dos oócitos não diferiam daqueles de folículos primários. A estrutura das CGs mantinha-se como descrita para os folículos primários, sendo que algumas apresentavam citoplasma de eletro-densidade diferente das demais.

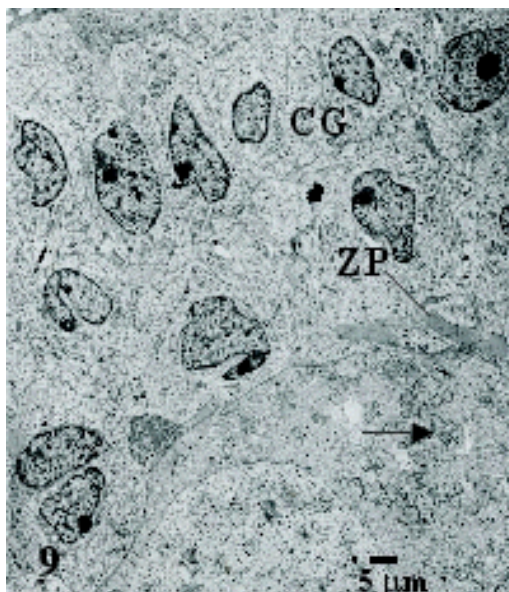


Figura 9

Folículo secundário de vaca, mostrando mais de duas camadas de CGs cuboidais (CG) e sinais de formação de zona pelúcida (ZP). As organelas estão espalhadas por todo o oolema (seta) e em maior número. 3.400 X.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo método mecânico de isolamento, utilizado neste estudo, mostraram uma quantidade suficiente de folículos pré-antrais isolados, assim como nos estudos de De Bem et al.⁴, com o uso do “Tissue Chopper” em ovários de vacas adultas da raça Nelore. Ainda em bovinos, outros métodos têm sido empregados no isolamento de folículos pré-antrais, obtendo-se grandes quantidades de folículos isolados em animais adultos²⁷, ou em fetos bovinos no terço final da gestação¹⁸. Os estudos relacionados à produção de embriões a partir de oócitos de folículos pré-antrais desenvolvidos *in vitro* necessitam de grandes quantidades de folículos viáveis para os sistemas de cultivo. Os resultados deste estudo confirmaram a possibilidade de se obter número suficiente de folículos pré-antrais de vacas adultas pelo uso do “Tissue Chopper”, sem utilização de enzimas e, portanto, sem maiores prejuízos à viabilidade das estruturas recuperadas.

Inicialmente, os folículos pré-antrais eram classificados de acordo com número de camadas de células granulosas ao redor do oócito²⁶. Esta classificação ainda é utilizada por diferentes autores³⁵. Em nosso experimento, os folículos pré-antrais foram classificados em folículos primordiais (oócitos rodeados por uma camada de CGs achatadas ou achatadas e cuboidais), folículos primários (oócito rodeado por uma

camada simples de CGs cuboidais) e folículos secundários (oócito rodeado por duas ou mais camadas de CGs cuboidais). Outros métodos de classificação têm sido usados, porém, sempre levando em consideração o número de camadas de células da granulosa ao redor do oócito^{3,6,14,17}.

As eletromicrografias obtidas de folículos pré-antrais em nosso estudo mostraram que, em alguns casos, os folículos primordiais apresentavam algumas CGs tendendo à forma cuboidal. Esta característica foi também observada por Fair et al.⁹. Tais folículos foram caracterizados como primordiais ativados, ou seja, mostrando os primeiros sinais de ativação e início de crescimento. O início do crescimento folicular tem sido descrito por mudanças ultraestruturais relacionadas à síntese de proteínas específicas, inclusive síntese de RNA para formação da vesícula germinativa²³. O crescimento de folículos primordiais bovinos até o estágio pré-ovulatório foi definido pelo aumento do diâmetro do oócito e proliferação e diferenciação das células granulosas, com posterior formação de *antrum*. De forma geral, nossos resultados mostraram oócitos grandes, com núcleo ocupando uma posição excêntrica no oolema, com regiões de cromatina condensada, além de apresentarem nucléolo bem definido. Nossos resultados confirmam as observações de Russe³¹, quando detectou que as CGs eram as primeiras a sofrerem modificações a partir do momento da ativação do folículo primordial.

Os mecanismos fisiológicos e endócrinos envolvidos na ativação dos folículos primordiais, levando ao crescimento *in vivo*, ainda são hipotéticos^{13,21}. A modulação de organelas citoplasmáticas, envolvendo aumento do número e migração para a periferia do citoplasma do oócito são outras modificações que sucedem a diferenciação das CGs observadas em nosso estudo. Estas características também foram descritas por Baker² e Fair et al.⁹. No entanto, Lucci et al.²⁵ não observaram a proximidade das organelas citoplasmáticas ao redor do núcleo do oócito em folículos primordiais de cabras.

Em geral, a ultraestrutura de folículos pré-antrais bovinos^{9,20} é semelhante à ultraestrutura de outras espécies de mamíferos, como caprinos²⁵, suínos¹⁴, felinos²² ou humanos²⁹. Algumas diferenças foram observadas entre as diferentes espécies e ao longo das diferentes fases do desenvolvimento folicular.

A membrana ovocitária dos folículos primordiais estudados mostrou zonas de aderência no contato com as células granulosas, bem como projeções (microvilos) penetrando no seu citoplasma. Estas estruturas foram recentemente implicadas na comunicação do oócito com as células foliculares por Albertini et al.¹ e Fair *et al.*⁹. Em nossos resultados, não foram observadas junções tipo Gap entre as células granulosas.

Nosso estudo também mostrou claramente que as

organelas, em sua maioria mitocôndrias redondas, concentravam-se na região ao redor do núcleo. Mitocôndrias arredondadas, contendo cristas periféricas e paralelas à membrana externa, foram as organelas mais evidentes no oócito de folículos primordiais e primários. Este tipo de mitocôndria também foi definido por Hyttel et al.²⁰ e Fair et al.⁹ como primitiva, a partir da qual dariam origem às formas alongadas e tipo “hooded”. Isto tem sido descrito também em outras espécies de mamíferos (Jewgenow; Stolte²²; Lucci et al.²⁵). Muitas mitocôndrias apresentavam um ou dois grânulos eletrodensos em todas as fases do desenvolvimento folicular. No folículo secundário, as mitocôndrias apareciam também em formato alongado, como relatado por Fair et al.⁹. As demais organelas, como gotas de lipídeos e retículos endoplasmáticos, apresentavam-se no oolema em número reduzido e os complexos de Golgi podiam ser visualizados ao redor do núcleo. Com o crescimento folicular, estas estruturas foram mais facilmente identificadas.

Os folículos pré-antrais analisados em nosso estudo, em todas as fases do desenvolvimento, apresentaram muitas vesículas formadas por membranas ao longo da superfície do oócito. Estas vesículas foram descritas por Fair et al.⁹ e confirmadas por Albertini et al.¹ como “coated pits”, estando relacionadas a processos de endocitose durante a comunicação do oócito com as células granulosas, permitindo a passagem de fatores de crescimento e proteínas, tanto na manutenção do bloqueio meiótico, como na estimulação para a maturação folicular.

Neste estudo, o folículo primordial não mostrava sinais de formação de ZP, vindo a ser observada somente em folículos primários bem definidos. Estas observações também foram

constatadas por Fair et al.⁹, quando encontraram poucos sinais de ZP nesta classe de folículos. A formação da zona pelúcida coincidiu com a presença de inúmeros microvilos do oócito penetrando na mesma, propiciando sua comunicação com as células granulosas. Uma característica encontrada em folículos secundários foi a presença de aglomerados de grânulos corticais espalhados pelo oolema ou próximos a complexos de Golgi. Segundo Wassarman³⁶, eles se fundem com o oolema durante a fertilização, liberam seu conteúdo (proteínases) e alteram as propriedades da ZP, evitando a polispermia. Em oócitos de camundongos, seu número foi estimado em cerca de 4.500 grânulos corticais ao longo do oolema. Fair et al.⁹ observaram grânulos corticais em oócitos de folículos mais desenvolvidos, associados a outras organelas, possivelmente envolvidas na sua formação.

Em conclusão, nosso estudo confirmou a eficiência do método mecânico de isolamento para folículos pré-antrais, também em vacas Nelore, mostrando a manutenção da estrutura tridimensional do folículo. Além disso, os folículos primordiais, primários e secundários analisados apresentaram muitas semelhanças com os folículos descritos em outras raças, na mesma fase de desenvolvimento, indicando a possibilidade de serem utilizados nos mesmos sistemas de crescimento *in vitro* pela facilidade de serem isolados em grande número e com manutenção de sua viabilidade.

AGRADECIMENTO

Agradecimentos pela concessão financeira à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

SUMMARY

Preantral follicles from 41 Nelore breed cows were described quantitative and ultrastructurally in the study. In the average, 35,539.20 preantral follicles were mechanically isolated (Tissue Copper) per animal. Follicles were processed for transmission electron microscopy. Primordial follicles presented an oocyte surrounded by a flattened granulosa cell layer, with some granulosa cells showing cuboidal shape. Other development stages were classified as primary follicles, with a granulosa cell layer around the oocyte and secondary stages, with oocyte surrounded by two or more cuboidal granulosa cell layer. Primordial follicles showed an evident oocyte, with the nucleus located at an eccentric cytoplasm position and a well-defined nucleolus, with condensed chromatin areas. Organelles were centered at the peri-nuclear area, showing mostly round shaped mitochondria. Follicles under development showed an increasing number of organelles and elongated mitochondria. Adherence zones, coated pits and endocytosis vesicles maintained the oocyte-granulosa cell interfaces. The zona pellucida (ZP) appeared in primary follicles, showed small microvilos and many vesicles, which permeated into the ZP. Secondary follicles presented clusters of cortical granules associated to Golgi complexes. In conclusion, the mechanical method provide a sufficient amount of preantral follicles from Nelore breed cows and, due to ultrastructural similarity with follicles from other breed, it is possible to use same protocols of culture, since the oocyte meiotic maturation is kept intact.

KEY-WORDS: Bovine. Preantral follicles. Isolation. Ultrastructure.

REFERÊNCIAS

1. ALBERTINI, D. F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. v. 121, p. 647-653, 2001.
2. BAKER, T. G. Electron microscopy of the primary and secondary follicles. **Advances in the Biosciences**. v. 6, p. 7-23, 1971.

3. CARROLL, J. et al. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 85, p. 489-494, 1990.
4. DE BEM, A. R. et al. Isolamento mecânico de folículos pré-antrais de ovários de vacas Nelore. **Arquivos da Faculdade de Veterinária-UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, n.1, 1997 (Suppl.).
5. EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. **Biology Reproduction** v. 41, p. 268-276, 1989.
6. ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**. v. 25, p. 800-805, 1966.
7. ESPER, C. R. Avaliação dos efeitos da congelação sobre blastocistos bovinos. Ribeirão Preto. Tese (Doutorado em ciências). **Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**. 120p. 1986
8. FAIR, T. et al. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**. v. 43, p. 503-512, 1996.
9. FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**. v. 195, p. 327-336, 1997.
10. FAIR, T. et al. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocyte in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**. v. 46, p. 208-215, 1997.
11. FIGUEIREDO, J. R. et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**. v. 40, p. 789-799, 1993.
12. FIGUEIREDO, J. R. et al. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**. v. 43, p. 845-858, 1995.
13. FORTUNE, J. E. et al. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 163, p. 53-60, 2000.
14. GREENWALD, G. S.; MOOR, R. M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 87, p. 561-571, 1989.
15. GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: **Laboratory Production of Cattle Embryos**. Cab International. Wallingford. Oxon. UK., p. 30-142, 1994.
16. GUTIERREZ, C. G. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 62, p. 1322-1328, 2000.
17. HULSHOF, S. C. J. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **12th Internatinal Congress of Animal Reproduction**. v. 7, p. 336-338, 1992.
18. HULSHOF, S. C. J. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**. v. 16: 2. P. 78-80, 1994.
19. HULSHOF, S. C. J. et al. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17b-estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**. v. 44, p. 217-226, 1995.
20. HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v. 47, n.1, p. 23-32, 1997.
21. JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. **Animal Reproduction Science**. v. 39, p. 285-297, 1995.
22. JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**. v. 44, p. 183-193, 1996.
23. KASTROP, P. M. M. et al. The effects of a-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis and phosphorylation during oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Developmental**. v. 28, p. 249-254, 1991.
24. LIU, J. et al. Live offspring by *in vitro* fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**. v. 64, p. 171-178, 2001.
25. LUCCI, C.M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**. v. 41, p. 61-69, 2001.
26. MANDL, A. M.; ZUCKERMAN, S. The relation of age to numbers of oocytes. **Journal of Endocrinology**. v. 7, p. 190-193, 1951.
27. NUTTINCK, F. et al. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**. v. 39, p. 811-821, 1993.
28. NUTTINCK, F. et al. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigation. **Theriogenology**. v. 45, p. 1235-1245, 1996.
29. OKTAY, K. et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**. v. 67, p. 481-486, 1997.
30. PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**. v. 55, p. 1193-1210, 2001.
31. RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**. v. 24, p. 77-92, 1983.
32. SANTIAGO, A. A. O Zebu na Índia, no Brasil e no mundo. **Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. Campinas**. p.706, 1985.
33. TELFER, E. E. et al. New approaches to increasing oocyte yield from ruminants. **Animal Science**. v. 68, p. 285-298, 1999.
34. TELFER, E. E. et al. *In vitro* development of oocyte from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 163, p. 117-123, 2000.

Andréa Cristina BASSO; Cesar Roberto ESPER Isolamento e caracterização ultraesrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n. 6, p. 311-319, 2002.

35. WANDJI, S. A. et al. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**. v. 55, p. 942-948, 1996.

36. WASSARMAN, P. Zona pellucida glycoproteins. **Annual Review Biochemical**. v. 57, p. 415-442, 1988.

37. WU, J. et al. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicles development in vitro. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 320-327, 2000.

38. WU, J. et al. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**. v. 64, p. 375-381, 2001.

Recebido para publicação: 26/11/2001
Aprovado para publicação: 19/08/2002