



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

FOLICULOGÊNESE, MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPASMÁTICA DE OÓCITOS

BUBALINOS – *Bubalus bubalis* – UMA ANÁLISE ESTRUTURAL

Por

Rafael Gianella Mondadori

Tese apresentada ao Departamento de Biologia
Celular como requisito à obtenção do título de
DOUTOR EM BIOLOGIA MOLECULAR.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Co-orientador: Dr. Rodolfo Rumpf

Brasília,

Junho de 2008

“Imagination is more important than knowledge. Knowledge is limited, imagination encircles the world.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Como em tudo que é trabalho, o primeiro agradecimento sempre é a Deus e certamente não sairei do lugar comum, apenas acrescentarei os espíritos amigos que me iluminaram durante toda a vida.

Aos meus pais, Tito e Lenira, que formaram meu caráter e ao meu irmão Rubens que sem dúvida faz parte da modelagem da minha personalidade.

A minha família, Ana, Rafaela, Martín e Miguel, estes sim, verdadeiros heróis por terem me aturado durante a realização deste trabalho, principalmente na fase final onde agüentaram meus maus humores pelo atropelo. E que, sem dúvida, o convívio com eles nesta encarnação está me transformando em um indivíduo muito mais preparado.

A todas as pessoas do BioRep da UFSM que me auxiliaram no início da carreira científica, principalmente, o Bayard e o Jairo, onde aprendi o que é uma pesquisa ética e como raciocinar cientificamente.

A Sônia que acreditou que eu seria capaz de desenvolver a tese mesmo sendo Coordenador de um curso e dando aula. Muito obrigado por tudo, sem sua compreensão e apoio e do pessoal do teu laboratório nunca eu teria chegado aonde cheguei. Desculpe pelas sumidas que eu dei e tinhas que me enviar aqueles e-mails com o assunto “Notícias”.

A toda Diretoria da UPIS, que acreditou em um recém mestre com 25 anos para implementar um curso de Medicina Veterinária que hoje é reconhecido por sua qualidade. Pelo apoio recebido com animais, tempo de dispensa e materiais utilizados em todos os experimentos. Aqui cabe também um agradecimento a todos os colegas do Departamento de Medicina Veterinária pelo constante apoio e principalmente pelas “trocas de aula” sempre que foi necessário.

Ao Andrei e ao Santin que, junto com a Carol, Elaine, Khesller e Juliana, “carregaram o piano” para que este trabalho fosse concluído. Também não posso me esquecer de todos os amigos que colaboraram de diferentes formas como o Pietro, o Nélcio, o Caique, o Rafael, o Chivas e por fim o Rodolfo que apoiou este projeto desde sua concepção há cinco ou seis anos atrás.

Finalizando, não poderia deixar de agradecer ao CNPq por ter propiciado auxílio financeiro para a elaboração de parte das atividades desenvolvidas nesta tese.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 - Importância dos bubalinos no Brasil e no mundo.....	3
2.2 - Anatomofisiologia da reprodução de búfalas	5
2.3 - Biotecnologias da reprodução em búfalas	7
2.3.1 - Inseminação Artificial (IA).....	7
2.3.2 - Transferência de Embriões (TE)	9
2.3.3 - Punção folicular (PF)	9
2.3.4 - Maturação in vitro (MIV)	10
2.3.5 - Fertilização in vitro (FIV)	11
2.3.6 - Cultura embrionária in vitro (CIV)	12
2.3.7 – Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA)	13
3. JUSTIFICATIVA	14
4. OBJETIVOS	15
5. CAPÍTULO 1	16
Objetivo Específico.....	16
Materiais e Métodos.....	16
Resultados e Discussão	18

Principais contribuições	21
6. CAPÍTULO 2	22
Objetivos Específicos.....	22
Materiais e Métodos.....	22
Resultados e Discussão	24
Principais contribuições	27
7. CAPÍTULO 3	29
Objetivo Específico:.....	29
Materiais e Métodos.....	29
Resultados e Discussão	32
Principais contribuições	35
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	36
9. BIBLIOGRAFIA	38
ANEXO 1	54
ANEXO 2	65
ANEXO 3	86

RESUMO

Os bubalinos apresentam grande potencial para serem utilizados tanto em propriedades com baixa como alta aplicação de tecnologia de produção, por ser uma espécie rústica e que produz principalmente leite com alto valor de mercado. Porém, devido às características inerentes a espécie, a aplicação de biotécnicas da reprodução que visam multiplicar animais de alto valor genético não tem demonstrado bons resultados. Assim sendo, o presente trabalho visou conhecer as características ultra-estruturais do desenvolvimento do gameta feminino da espécie. Para isto foram utilizados ovários e complexos cumulus-oócito (CCOs) de búfalas, devidamente processados para microscopia eletrônica de transmissão e microscopia óptica. Foi observado que os gametas e folículos pré-antrais dos bubalinos são menores que os bovinos e possuem conteúdo lipídico (que se acumula gradativamente) bastante superior a esses. Os bubalinos apresentaram menor número de folículos pré-antrais nos ovários, além disso, houve uma predominância de folículos classificados como primários em detrimento dos primordiais e secundários. Outro fator que pode impactar a aplicação de biotecnologias como a punção folicular, bem como a biosegurança é o fato da zona pelúcida dos oócitos bubalinos ser aparentemente mais frágil e conter mais fendas que a dos bovinos. A maturação citoplasmática dos bubalinos foi caracterizada pela migração de organelas para a região cortical do oócito. Somando-se a essa característica o fato que houve aumento do espaço perivitelínico e a diminuição gradativa do contato entre as células do *cumulus oophorus* e o oócito conforme a maturação evolui. Por fim, o presente trabalho

confirmou que a possível alteração química sofrida pelos lipídeos durante o processo de maturação *in vitro* ocasiona uma modificação de seu aspecto ultra-estrutural no início do período de maturação. Ressalta-se o fato que também foi comprovado que, com as devidas modificações no sistema de produção *in vitro* de embriões, é possível obter-se embriões viáveis de búfalas, mesmo na contra estação.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica de transmissão, maturação *in vitro*, morfometria, microscopia óptica, população de folículos pré-antrais.

ABSTRACT

The rusticity and milk production with high market value make possible to buffalos be bred in low or highly technified production system. On the other way, some species' inherent characteristics make difficult to apply reproductive biotechniques to multiply animals (mainly females) with high genetic potential. Considering this, the present research established the ultrastructural characteristics of female gamete development. To achieve the objective, buffalo cumulus-oocyte complexes (COCs) and ovaries were properly processed to light and transmission electron microscopy. The buffalo oocyte and preantral follicles were smaller than bovine ones and have higher lipid content (progressive accumulation). The specie also shows a lower number of preantral follicles in the ovaries, as well as, the number of primary is superior to primordial and secondary follicles. Other described factors which affects the application of ovum pick-up technique, other than the biosecurity, is the apparently fragile aspect of *zona pellucida* and the presence of fissures in its surface. Buffalo oocyte cytoplasmic maturation was characterized by organelle migration to cortical region. In addition, as the maturation progress, the perivitelline space increased in size and it is possible to observe a progressive reduction on granulosa cells and oocyte connections. In conclusion, the present research confirmed that the chemical modifications possibly suffered by oocyte lipids during *in vitro* maturation period, cause an alteration in its ultrastructural aspect. It is also important to note that is possible, with some modifications on *in vitro* embryo production systems, to produce buffalo embryo in seasonal anoestrous.

Key words: Transmission electron microscopy, *in vitro* maturation, morphometry, optical microscopy, preantral follicles population.

1. INTRODUÇÃO

Vários pesquisadores do Brasil e do mundo têm concentrado seus estudos no desenvolvimento de técnicas que permitam a máxima exploração do potencial reprodutivo de animais de elevado padrão genético. A sincronização de estro, a inseminação artificial, a transferência de embriões e fertilização *in vitro* são exemplos de biotécnicas já correntemente utilizadas, porém em bubalinos, os índices da superovulação seguida de transferência de embriões e da produção *in vitro* de embriões, estão muito aquém dos obtidos em bovinos. Assim sendo, as biotécnicas disponíveis para multiplicação da genética das fêmeas são pouco eficientes.

Os bubalinos, por serem mais rústicos que os bovinos e produzirem um leite com maior valor de mercado, são uma alternativa muitas vezes para os pequenos produtores rurais. Diante disso, o aprimoramento genético da espécie é de importância para a economia dessas propriedades.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas em transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões bubalinos, porém até o presente momento não havia um embasamento ultra-estrutural específico para a oogênese da espécie. Assim sendo os trabalhos eram realizados sem base de comparação, sempre se adaptando dados dos bovinos. Por isso a presente tese objetiva observar os eventos ultra-estruturais que ocorrem na gametogênese dos bubalinos e que refletem na fisiologia da espécie.

A seguir será feita uma breve revisão de literatura enfocando os aspectos mais relevantes referentes ao assunto. A revisão de literatura não tratará de aspectos de ultra-estrutura de folículos ou oócitos, visto que a presente tese descreve pela primeira vez as características ultra-estruturais da gametogênese de bubalinos. Posteriormente será apresentada a contribuição científica deste trabalho sob a forma de três artigos científicos (um publicado, um aceito para publicação e outro submetido a periódicos internacionais), referentes a estudos ultra-estruturais do oócito bubalino durante a foliculogênese e a maturação *in vitro*, onde serão descritas as diferenças e semelhanças com outras espécies animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Importância dos bubalinos no Brasil e no mundo

Os búfalos foram domesticados há aproximadamente cinco mil anos na Índia, onde o rebanho está, atualmente, distribuído em pequenas propriedades, correspondendo a um terço da população de bovinos sendo responsável por 70% da produção de leite do país. Apesar de pertencerem à mesma espécie, *Bubalus bubalis*, os búfalos são classificados em duas grandes categorias: búfalos do rio e búfalos do pântano, com base na sua aparência, habitat e forma de utilização. Os búfalos do rio possuem 50 cromossomos e são criados para produção de leite, no entanto, também contribuem para produção de carne e tração animal. Os búfalos do pântano possuem 48 cromossomos e têm, como função principal, a tração animal (Manik et al., 2002a). Ressalta-se ainda que é possível o cruzamento entre búfalos do rio e do pântano (Liang et al., 2007).

Os bubalinos ocupam nichos específicos de mercado em vários locais do mundo, produzindo leite, carne e força de trabalho. Nos últimos 30 anos a população mundial da espécie (173.921.455) cresceu 53% enquanto que a população de bovinos, no mesmo período, obteve um crescimento de 15% (FAO, 2006). Desde 1973, a produção mundial de leite de bubalinos apresentou um crescimento de aproximadamente 200% (Rocha Loures, 2001).

Desde 1975, no Brasil, o rebanho bubalino aumentou 310%, sendo a população atual de aproximadamente 1.095.000 animais. No mesmo período a

população brasileira de bovinos aumentou 123% (FAO, 2006). Conforme pode ser observado a partir dos dados apresentados, a população bubalina tem mostrado um crescimento bastante elevado no Brasil e no mundo. Assim, considerando a atual situação econômica/social do Brasil e as características de produção dessa espécie animal, o búfalo apresenta-se como uma importante opção para pequenas propriedades rurais.

Uma das principais características que tornou o búfalo um animal importante nos países Asiáticos foi sua extraordinária habilidade de converter fibra em energia, tornando-o um animal com maior rusticidade e adaptabilidade. Considerando o exposto, o búfalo não compete com os humanos pelos principais produtos agrícolas, como milho e soja, e, por isso, torna-se uma eficiente ferramenta na reciclagem de nutrientes em sistemas integrados de produção.

A Itália serve como exemplo de que a bubalinocultura não é uma atividade restrita para agricultura familiar. Neste país, o leite da espécie é utilizado para produzir a *Mozzarella*, o que se converte em uma importante fonte de lucros para a propriedade. Atualmente, a Itália possui uma população aproximada de 200 mil animais, que produzem, em média, 2000 litros de leite por lactação. Toda a produção é voltada para a fabricação de *Mozzarella* e, em sua maioria, é extremamente tecnificada (Addeo e Mucchetti, 2001; Alexiev, 2001).

Tendo em vista a grande importância econômica que os búfalos possuem com base em suas características de produção e rusticidade, acredita-se que a multiplicação desses animais deva ser intensificada com o auxílio de

biotécnicas da reprodução tais como a inseminação artificial, a transferência de embriões, a produção de embriões *in vitro* (Baruselli e Carvalho, 2003; Drost, 2007a), a clonagem (Shi et al., 2007) e o isolamento e cultivo de folículos pré-antrais (Santos et al., 2006).

A eficiência reprodutiva é um dos fatores primordiais que afetam a produtividade e é prejudicada por algumas características inerentes à fêmea bubalina tais como: maturidade tardia (Madan e Prakash, 2007), poliestria estacional (Baruselli et al., 1993; Drost, 2007b), gestação mais longa que a bovina (Madan e Raina, 1984; Madan, 1988) e anestro pós parto longo (El-Wishy, 2007). Assim sendo, antes de especificar os experimentos a serem realizados será descrita uma revisão sobre os padrões e eficiência reprodutiva das fêmeas bubalinas.

2.2 - Anatomo-fisiologia da reprodução de búfalas

O ovário da búfala é alongado e consideravelmente menor que o da vaca. Sua dimensão média é de 22-26X11-18X11-17 mm (El-Wishi et al., 1971; Fadle et al., 1974) e seu peso em torno de 3,4 g (Vittoria, 1997). O corpo lúteo (CL) da búfala encontra-se incrustado profundamente no estroma ovariano, geralmente é menor que o do bovino (Roy e Mullick, 1964) e parece não haver diferença funcional (indicada pela presença de CL) entre ovários direito e esquerdo (Danell, 1987). Assim como em bovinos, o CL de búfalas responde com aumento da produção de progesterona a aplicação exógena de análogos do GnRH (Campanile et al., 2007).

O ciclo estral da espécie tem duração média de 20-25 dias (Agarwal e Purbey, 1983; Manik et al., 1998), sendo que o estro tem uma duração aproximada de 20 horas (Kanai e Shimizu, 1983; Shimizu, 1987), podendo variar de 4 a 64 horas (Baruselli e Henríquez, 2004). O intervalo entre o final do estro e a ovulação é de 11 a 24 h, dependendo da raça de búfalo (Singh et al., 2000). As búfalas em cio, além de permitirem a monta do macho, apresentam queda na produção leiteira, micção freqüente e descarga mucosa vulvar (Kamizi, 1983; McCool et al., 1989). Cabe ressaltar que, durante o estro das búfalas, quando comparada com vacas, seu comportamento é menos “previsível” e praticamente não demonstram comportamento homossexual (Baruselli, 1994).

Nas regiões tropicais próximas ao Equador o búfalo é um animal poliestral contínuo, ciclando durante todo o ano. Porém, ao se afastar do equador, quando ocorre variação anual das horas de luz do dia a espécie torna-se poliestral sazonal de dias curtos (Vale e Ribeiro, 2005). Esse efeito sazonal é regulado pela melatonina liberada pela glândula pineal (Bittman and Karsch, 1984) que apresenta ritmo circadiano e representa um sinal endócrino que serve de gatilho para outros hormônios envolvidos nas funções reprodutivas (Precisse, 2007).

Os ovários direito e esquerdo da búfala têm um número similar de folículos primordiais (Danell, 1987) e sua população foi estimada em 19.000 estruturas (Samad e Nasser, 1979). Essa quantidade, aproximadamente dez vezes menor do que em bovinos (Erickson, 1966), provavelmente seja o principal fator que leva a um menor número de folículos antrais nas búfalas (Manik et al., 2002a). Os ovários de búfalas parecem conter apenas 20% do

total de folículos antrais encontrados em ovários de vacas (Ty et al., 1989), sendo que, aproximadamente 82% desse total possuem aparência histológica de atrésicos (Ocampo et al., 1994). O número total de folículos antrais de diversos diâmetros na superfície de ovários de búfalas abatidas em diferentes fases do ciclo estral varia de 5,14 (Kumar et al., 1997) a 6,06 (Madan et al., 1996).

A dinâmica do desenvolvimento folicular em búfalas está sendo estudada com o auxílio da ultra-sonografia. Essa técnica permitiu comprovar que nessa espécie, o desenvolvimento folicular, assim como em bovinos (Ginther et al., 1989), acontece em ondas (Baruselli et al., 1997), sendo que a maioria das búfalas apresenta um ciclo com duas ondas de crescimento folicular (Manik et al., 1994). Apesar dos diversos esforços que vem sendo envidados no sentido de estudar o desenvolvimento folicular em bubalinos, até a presente data, não existe publicação referindo-se a um estudo detalhado da ultra-estrutura de folículos/oócitos bubalinos nas diferentes fases de seu desenvolvimento.

2.3 - Biotecnologias da reprodução em búfalas

2.3.1 - Inseminação Artificial (IA)

Baruselli e Henríquez (2004) preconizam que a IA em bubalinos deve levar em consideração que as búfalas sejam inseminadas no momento que não aceitam mais a monta. De um modo geral, um percentual de 62,23% dos animais é inseminado conforme o modelo dos bovinos, ou seja, detectada em

cio à tarde, inseminada no outro dia pela manhã. Detectada em cio pela manhã, inseminada à tarde. No entanto, búfalas que apresentam cios de duração diferente (38,77%), são inseminadas quando não aceitam mais a monta. De um modo geral esse manejo de inseminação permite, no final da estação reprodutiva, um percentual de gestação entre 75 e 80%.

Conforme já discutido anteriormente, as búfalas não demonstram os sinais de estro com a mesma regularidade que as vacas (Zicarelli et. al., 1997a), sendo assim, a etapa de detecção de cio é uma das principais responsáveis pelos baixos índices de utilização de IA. Recentemente, foi preconizado que o fato da espécie não demonstrar sinais de estro com intensidade pode estar relacionado com o tamanho inferior e a taxa de crescimento lenta dos folículos ovarianos (Awasthi et al., 2007). Assim sendo, o uso de esquemas de manejo que não necessitem de detecção do estro contribuem para aumentar o uso de IA em bubalinos (De Rensis e López-Gatius, 2007).

Diversos protocolos para IA com tempo fixo vêm sendo pesquisados em bubalinos com resultados bastante promissores. O uso do protocolo Ovsynch, proposto por Baruselli et al., (1999) resultou em uma taxa de concepção de 48,8%, sendo que esse índice é bastante influenciado pela condição corporal do animal e pela sazonalidade das búfalas (Baruselli e Carvalho, 2004). Diversas tentativas visando otimizar os resultados com a substituição de alguns hormônios no protocolo original (Berber, et al., 1999; Carvalho, et al., 2004) e associando progesterona a esse (Baruselli et al., 2003a), não tem resultado em melhoras na taxa de concepção. Os protocolos de sincronização com uso de

progesterona/progestágenos e estradiol têm mostrado baixa eficiência (Zicarelli et al., 1997b).

2.3.2 - Transferência de Embriões (TE)

O uso de diferentes hormônios/protocolos para a superovulação de búfalos (Misra et al., 1998; Carvalho, 2001; Baruselli et al., 2003b) tem resultado na resposta de apenas 50 a 55% das búfalas e, as que respondem, ovulam apenas de duas a quatro estruturas, produzindo um ou dois embriões viáveis (Manik et al., 2002b; Snel-Oliveira et al., 2004). Apesar dos tratamentos superovulatórios em búfalas terem iniciado há aproximadamente 30 anos, baseados na adaptação dos protocolos de bovino, poucos estudos tem sido feitos no sentido de avaliar o comportamento e a estrutura folicular. Como comprovação da baixa eficiência da técnica, pode ser observado que, mesmo que o primeiro búfalo oriundo de transferência de embriões tenha nascido em 1983 (Drost et al., 1983), até a presente data existem poucos descendentes oriundos da aplicação dessa biotécnica reprodutiva.

2.3.3 - Punção folicular (PF)

A PF em búfalas produz, em média, 2,4 oócitos de boa qualidade por ovário (Gasparrini et al., 2000; Drost, 2007a; Manjunatha et al., 2008), sendo, portanto bastante inferior a média de 10 estruturas obtidas nos bovinos. Os complexos cumulus-oócito de búfalas, segundo Zicarelli e Gasparrini (2004) são

classificados em grau A, B, C e D, sendo os de grau A e B factíveis de serem usados para produção de embriões *in vitro* (PEIV). Apesar da classificação proposta, a capacidade de desenvolvimento dos complexos cumulus-oócito (CCOs) A e B de um grupo de animais mais produtivo, pode ser diferente da de outro grupo menos produtivo (Zicarelli et al., 2003) evidenciando assim, que essa classificação deve ser mais bem estudada.

Segundo Zicarelli e Gasparini (2004) e Baruselli et al., (2007) a associação da PF com a PEIV tem potencial superior à superovulação para otimizar o progresso genético a partir da linhagem materna. Apesar da PEIV em búfalo produzir mórulas/blastocistos (Boni et al., 1997) e até gestações (Neglia et al., 2003a), a eficiência tem sido muito baixa (Madan et al., 1996).

2.3.4 - Maturação *in vitro* (MIV)

O sucesso da PEIV está relacionado diretamente com o conhecimento dessa fase inicial do processo. Um estudo realizado por Neglia et al., (2001), utilizando microscopia confocal, revelou que a maturação nuclear *in vitro* em búfalos ocorre em um período inferior a dos bovinos. Assim sendo, apesar de ser possível ter uma indicação da maturação nuclear através da visualização da extrusão do primeiro corpúsculo polar para o espaço perivitelínico, o estudo da maturação citoplasmática, associada à nuclear, não foi executado até o presente momento. Concluindo-se assim que não existem informações sobre os eventos citoplasmáticos que acompanham a maturação nuclear de oócitos que pode ser observada no estereomicroscópio.

Diferentes meios de maturação vêm sendo utilizados para CCOs bubalinos, sendo que altas taxas de maturação nuclear são obtidas quando se associa hormônios (gonadotrofinas e estrógenos; Neglia et al., 2003b) e, assim como nos bovinos, as células do cumulus tem papel importante durante o processo de maturação (Pawshé e Totey, 1993), porém ainda não foram descritas as relações morfológicas existentes entre cumulus e oócito.

Segundo Gasparrini (2002), devido ao seu alto conteúdo lipídico, o oócito dos bubalinos é especialmente sensível aos processos oxidativos que ocorrem durante a maturação. A glutathiona reconhecidamente protege os oócitos contra o estresse oxidativo, sendo que o nível desse composto aumenta durante a maturação *in vivo* e essa reserva protege o oócito em estágios posteriores do desenvolvimento (Perreault et al., 1988). A cisteamina é um composto de baixo peso molecular que quando adicionada ao meio de maturação tem se mostrado eficaz em elevar os níveis de glutathiona nos oócitos (de Matos et al., 1996, 2000). Assim sendo, a adição de 50 μ M de cisteamina (Gasparrini et al., 2000) ao sistema de maturação *in vitro* de oócitos bubalinos aumenta o percentual de mórula compacta e blastocistos produzidos. Gasparrini (2002) afirma que o mecanismo de atuação desse composto permanece desconhecido, assim sendo, mais estudos devem ser realizados buscando esclarecer as modificações promovidas pelo composto nos oócitos de bubalinos.

2.3.5 - Fertilização *in vitro* (FIV)

Nos bubalinos, a eficiência da fertilização é inferior à observada em bovinos, ou seja, apesar de uma taxa de maturação nuclear similar (87% VS 94%) a taxa de clivagem é bastante inferior (65% VS 84%) (Zicarelli e Gasparrini, 2004), demonstrando que a maturação citoplasmática dos oócitos dos bubalinos deve ser estudada com mais propriedade buscando um sistema que melhore as condições existentes.

A fecundação é normalmente feita em meio TALP suplementado com heparina, hipotaurina e penicilamine (Gasparrini et al., 2004), utilizando-se 2×10^6 espermatozoides/ml, por 18 a 20 horas. Além disso, a concentração de heparina necessária para capacitar a célula espermática parece estar entre 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de meio (Mehmood et al., 2007). Assim como em bovino, as células do cumulus exercem um papel positivo durante a fecundação (Nandi et al., 1998), demonstrando a importância do estudo da interação entre essas células e o oócito.

2.3.6 - Cultura embrionária in vitro (CIV)

Em bubalinos, a CIV pode ser realizada em co-cultura com células de linhagem definida (células VERO ou BRL) ou com meios semi-definidos como SOF e Potassium Simplex Optimized (Zicarelli et al., 2003). Em um estudo realizado por Boni et al., (1999) foi obtido um percentual maior de blastocistos em SOF do que no co-cultivo com células BRL (13.5% VS 7%), além disso, no meio definido o desenvolvimento embrionário foi mais rápido do que no co-cultivo.

2.3.7 – Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA)

Além de sua grande importância nos estudos referentes a compreensão da foliculogênese, a MOIFOPA é uma biotécnica capaz de recuperar milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário através do isolamento. Tais folículos são fonte de oócitos que podem ser destinados para a produção *in vitro* de embriões. Eppig e O' Brien (1996) obtiveram o primeiro nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Com o aperfeiçoamento da técnica, mais recentemente, a mesma equipe voltou a relatar o nascimento de 59 camundongos (O'Brien et al., 2003).

Recentemente Gupta et al. (2008), produziram embriões bubalinos a partir da fertilização de oócitos derivados de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Nas demais espécies domésticas, os resultados mais satisfatórios foram obtidos em suínos (Wu et al., 2001). Em outros mamíferos, aonde os estudos vem sendo realizados há mais tempo, como bovinos, caprinos e ovinos, foi obtida a formação de antro a partir de folículos secundários isolados e cultivados *in vitro* (Gutierrez et al., 2000; Cecconi et al., 1999; Huamin e Yong, 2000). Diante disso fica evidente o potencial da aplicação desta biotécnica na espécie bubalina.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando os dados estatísticos, pode-se observar que o rebanho bubalino mundial vem apresentando taxas de crescimento bastante superiores ao de bovino. Crescimento esse que é reflexo das aptidões da espécie, sendo que ela se adapta aos diferentes métodos de criação, desde o mais tecnificado ao mais extensivo, fazendo com que a demanda por indivíduos de alto potencial genético seja bastante elevada.

Visto que a TE tem desempenho muito limitado na espécie, também ficam bastante evidentes as dificuldades encontradas para aumentar o número de descendentes de fêmeas geneticamente superiores, sendo que atualmente a PEIV é a opção mais viável para esse fim.

Ao avaliar o conhecimento disponível podem ser observadas grandes diferenças entre os bubalinos e outros ruminantes, principalmente bovinos, o que demonstra a importância de conhecer a foliculogênese da espécie, evitando-se a importação direta de protocolos desenvolvidos para bovinos. Assim sendo, estes estudos aqui programados visaram aprofundar os entendimentos do processo de foliculogênese e maturação citoplasmática de oócitos, permitindo o incremento das ferramentas de avaliação para a busca de um meio de maturação que mimetize, com maior precisão, o processo ocorrido *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a estrutura de folículos e oócitos bubalinos, envolvendo aspectos ultra-estruturais, visando embasar estudos que permitam otimizar a utilização de biotécnicas como a superovulação seguida de coleta e transferência de embriões, a produção de embriões *in vitro* e a MOIFOPA.

4.2. Objetivos Específicos

De um modo geral este trabalho descreveu a ultra-estrutura de folículos pré-antrais dos bubalinos, bem como dos oócitos contidos em folículos antrais e as modificações sofridas por estes durante a maturação *in vitro*.

A tese foi dividida em três Capítulos, correspondentes aos três artigos científicos, publicado, aceito e submetido à publicação. Os Objetivos Específicos, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, bem como as Principais Contribuições de cada artigo são apresentados em seus respectivos Capítulos.

5. CAPÍTULO 1

Capítulo referente ao trabalho publicado com título “Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles”. (ANEXO 1)

O presente estudo objetivou aumentar o conhecimento existente no que se refere ao desenvolvimento de folículos pré-antrais em bubalinos, descrevendo os aspectos morfológicos e ultra-estruturais dessas estruturas em ovários de búfalas adultas. O oócito e as células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários foram estudados com a utilização de microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

Objetivo Específico

- Estudar a ultra-estrutura do oócito bubalino de folículos pré-antrais, bem como sua interação com as células foliculares.

Materiais e Métodos

Ovários: Aproximadamente 20 ovários foram obtidos de 10 búfalas púberes, abatidas em abatedouro local. Os animais possuíam entre sete e 10 anos e seus ovários apresentavam estrutura ovariana compatível com ciclicidade.. Os ovários foram mantidas em solução salina a 0,9% com

antibiótico, sendo então lavados e pequenas porções do córtex ovariano foram dissecadas sob estereomicroscópio.

Preparação para microscopia óptica: As porções do córtex ovariano foram fixadas em Bouin por 24 horas, desidratadas com álcool, clarificadas com xilol e incluídas em parafina. Os cortes seqüenciais de 5µm foram corados com hematoxilina e eosina.

Preparação para microscopia eletrônica de transmissão: As porções de córtex ovariano foram fixadas em solução de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,2) a 4°C por 24 horas. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio. Após isso, o material foi contrastado *in block* com acetato de uranila 0,5% e desidratado com acetona. Para a realização dos cortes semi-finos (2µm), as porções de tecido foram incluídas em resina Spurr. Esses cortes foram corados com azul de toluidina para classificação dos folículos pré-antrais. Os cortes ultrafinos (90nm) foram feitos dos folículos observados como intactos na microscopia óptica e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, para serem analisados no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011), operado a 80 Kv.

Análise histológica: Os folículos pré-antrais foram classificados em primordial, primário ou secundário de acordo com a forma e o número de camadas das células da granulosa. As análises foram feitas em 10 fragmentos obtidos de 10 animais diferentes. As mensurações foram realizadas usando uma ocular micrométrica na região equatorial do oócito, ou seja, com a presença do

seu núcleo. Os folículos que apresentavam sinais de atresia não foram usados para a caracterização morfométrica.

Análise estatística: Os dados morfométricos foram tratados por análise de variância usando o tipo de folículo como efeito fixo e o diâmetro do oócito e do folículo com variáveis dependentes. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A análise de regressão foi realizada relacionando o diâmetro do folículo com o diâmetro do oócito. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0.05$.

Resultados e Discussão

Morfometria e microscopia óptica: Os folículos primordiais (oócito rodeado por uma camada de células pavimentosas), primários (oócito rodeado por uma camada de células cúbicas) e secundários (oócito rodeado por mais de uma camada de células cúbicas) presentes nos ovários de búfalas estão apresentados nas figuras 1A, 1B e 1C do Anexo 1. Assim como em bovinos (Fair et al., 1997), a proliferação e reestruturação das células da granulosa são os primeiros sinais morfológicos observados na ativação de folículos primordiais em búfalos. As medidas para todas as categorias de folículos pré-antrais, bem como o diâmetro de seus oócitos estão descritos na Tabela 1 do Anexo 1 e pode ser observado que são inferiores aos dos bovinos europeus (Hyttel et al., 1997) e zebuínos (Kacinski et al., 2005). Porém semelhantes aos dados dos camundongos (Bayrak e Oktay, 2003) e superior aos descritos para ovinos (van den Hurk e Zhao, 2005) e caprinos (Lucci et al., 2001). O formato alongado dos

folículos secundários descrito por van Wezel e Rodger (1996) em bovinos europeus também foi observado em bubalinos devido ao acúmulo de células da granulosa em pólos opostos do oócito. Finalizando a análise morfométrica, a Figura 2 do Anexo 1 demonstra a regressão linear altamente significativa entre diâmetro do folículo e diâmetro do oócito.

Ultra-estrutura do folículo primordial: O oócito de ovóide a esférico é rodeado por 4 a 8 células da granulosa achatadas e possui um ooplasma repleto de vesículas de diferentes diâmetros. O núcleo ocupa uma região central ou excêntrica do oócito e são observadas algumas figuras de mielina (Figura 3A – Anexo 1). As mitocôndrias são predominantemente arredondadas com cristas transversais, além disso, são observadas diversas cisternas de retículo endoplasmático rugoso tanto no ooplasma como no citoplasma das células da granulosa (Figura 3B – Anexo 1) e a zona pelúcida ainda não está presente nessa fase.

Ultra-estrutura do folículo primário: O oócito esférico é rodeado por uma camada de oito a 20 células cúbicas da granulosa. A zona pelúcida começa a ser formada nessa fase (Figura 4A – Anexo 1), além disso algumas microvilosidades do oócito também iniciam a aparecer. As vesículas continuam presentes em grande quantidade no ooplasma, apresentando coalescência (Figura 4B – Anexo 1).

Ultra-estrutura do folículo secundário: Nessa fase pode ser observado um aumento na quantidade de mitocôndrias, principalmente em um formato arredondado (Figura 5A – Anexo 1). Nessa categoria de folículos algumas células da granulosa adquirem um formato mais colunar (Figura 5B – Anexo 1),

diferente do cúbico normalmente observado e é possível ressaltar a formação da zona pelúcida que envolve microvilosidades do oolema. Na Figura 6 do Anexo 1, pode ser observado que as figuras de mielina são mais freqüentes em folículos secundários do que nas duas categorias que o antecedem.

De uma forma geral a ultra-estrutura de folículos pré-antrais de bubalinos é semelhante à de outros mamíferos, porém algumas diferenças são observadas na quantidade de vesículas citoplasmáticas, formato e conteúdo da mitocôndria, formação da zona pelúcida e junções entre células da granulosa e oócito. Assim sendo, essas diferenças podem ser responsáveis por algumas diferenças funcionais observadas entre bovinos e bubalinos na produção *in vitro* de embriões (Neglia et al., 2003b) e dinâmica folicular (Manik et al., 2002a).

Boni et al (1992) observaram uma grande quantidade de vesículas no ooplasma de oócitos provenientes de folículos antrais e o presente estudo demonstrou que essas estruturas estão presentes desde o início da gametogênese, diferente do que ocorre em bovinos (Fair et al., 1997).

No presente trabalho, assim como em caprinos (Lucci et al., 2001), não foi observado nenhum tipo específico de junção entre oócito e células da granulosa, diferente do observado em bovinos (Fair e Hyttel, 1997), felinos (Jewgenow e Stolte, 1996), macacos (Zamboni, 1974) e coelhos (Nicosia et al., 1975). Como em todos os folículos observados no presente trabalho, o oócito não estava completamente rodeado por zona pelúcida, pode ser suposto que as junções comunicantes não são necessárias nessa fase e as substâncias

necessárias para o metabolismo do oócito passam para seu citoplasma por difusão.

Diferente do observado em bovinos (Fair et al., 1997), a deposição da zona pelúcida em bubalinos inicia-se na fase de folículo primário e não de secundário. Essa deposição ocorre simultaneamente à formação de microvilosidades pelo oócito para que o contato com as células da granulosa sejam mantidos.

Principais contribuições

- O diâmetro do oócito e o número de células da granulosa que formam as três categorias de folículos pré-antrais (primordial., primário e secundário) de bubalinos são inferiores ao de bovinos;
- O ooplasma de oócitos inclusos em todas as categorias de folículos pré-antrais possui uma grande quantidade de vesículas que provavelmente albergavam lipídeos removidos durante o histoprocessamento;
- As vesículas aumentam de quantidade e coalescem conforme o folículo se desenvolve;
- Não foram observadas junções específicas entre as células da granulosa e o oócito em folículos pré-antrais de bubalinos;
- A formação da zona pelúcida inicia-se mais precocemente que em bovinos.

6. CAPÍTULO 2

Capítulo referente ao trabalho aceito para publicação com o título “Buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte” (ANEXO 2).

Observando-se a escassez de informações referentes à foliculogênese bubalina, principalmente no que refere as modificações ultra-estruturais ocorridas durante o desenvolvimento dos folículos antrais, bem como a necessidade de atualização das informações referentes à população de folículos pré-antrais, os experimentos descritos nesse capítulo foram desenvolvidos para elucidar importantes informações a respeito da foliculogênese bubalina.

Objetivos Específicos

- Estudar a ultra-estrutura do oócito bubalino de folículos antrais, bem como sua interação com as células foliculares;
- Quantificar a população de folículos pré-antrais nos ovários bubalinos.

Materiais e Métodos

Coleta de Ovários: Dez ovários foram obtidos de cinco búfalas púberes, durante o outono. Os animais possuíam entre 7 e 10 anos e ciclavam normalmente antes do procedimento cirúrgico, além disso, a condição corporal

dos animais encontrava-se entre 2 e 3 (Moreira et al., 2000). Um dos ovários de cada animal foi mantido em solução salina a 0,9% com antibiótico e outro foi imediatamente fixado para microscopia óptica.

Procedimento para estimar a população de folículos pré-antrais: Visando estimar a população folicular, os ovários fixados foram divididos ao meio e processados para histologia conforme descrito por Lucci et al (1999). O tecido foi cortado de forma seriada com 5µm de espessura e corado com PAS e hematoxilina. O número de folículos pré-antrais (primordial., primário e secundário) foi estimado conforme descrito por Cahill et al (1979), usando o núcleo do oócito como marcador e o fator de correção descrito por Gourgeon e Chainy (1987). Foram contados apenas folículos morfologicamente normais sendo analisadas a integridade da membrana basal, a densidade celular, a presença ou ausência de corpos picnóticos e integridade do oócito.

Coleta dos complexos cumulus oócito (CCOs) e preparação para microscopia eletrônica de transmissão: Os folículos antrais dos ovários mantidos em solução salina foram medidos e puncionados individualmente. Os CCOs, associados ao diâmetro folicular, foram morfologicamente classificados sob estereomicroscópio, conforme descrito por Zicarelli e Gasparrini (2004) e fixados em solução de Karnovisky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,2) a 4°C por 24 horas. Conforme descrito por Hyttel e Madsen (1987), antes da pós-fixação as estruturas foram incluídas em 4% de ágar bacteriológico. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio. Após isso, o material foi contrastado *in block* com acetato de uranila 0,5% e desidratado com acetona. Para a realização dos

cortes semi-finos (2 μ m), as porções de tecido foram incluídas em resina Spurr. Esses cortes foram corados com azul de toluidina para observação do núcleo o oócito (região equatorial). Os cortes ultrafinos (90nm) foram feitos dos CCOs com núcleo intacto e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, para serem analisados no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011), operado a 80 Kv.

Resultados e Discussão

Número de folículos pré-antrais: O número médio de folículos pré-antrais nos ovários foi estimado em 19.819 estruturas, distribuídos da seguinte forma: 3.519 folículos primordiais, 14.672 folículos primários e 1.628 folículos secundários. Conforme pode ser observado na Tabela 1 do Anexo 2, o número de folículos por ovário varia consideravelmente de animal para animal, de 2.997 a 37.417 estruturas, podendo dessa forma explicar as variações observadas na produção de gametas observada entre animais da mesma espécie. O número de estruturas observadas no presente trabalho foi semelhante ao descrito por Danell (1987) e Samad e Nasser (1979) para a espécie, porém muito inferior ao descrito para bovinos europeus (Erickson, 1966) ou zebuínos (Lucci et al., 2002), além de também ser inferior ao observado em outros ruminantes. Diante disso, é possível inferir que o menor número de folículos antrais presentes na superfície do ovário bubalino (Ty et al., 1989) é devido ao baixo número de folículos pré-antrais da espécie. Assim como descrito no Capítulo 1 e por outro estudo (Santos et al., 2006), o maior

número de folículos primários em relação aos secundários parece ser uma característica inerente à espécie.

Caracterização ultra-estrutural do oócito de folículos antrais: A Figura 1 do Anexo 2 mostra a ultra-estrutura de um CCO proveniente de um folículo antral de 1 mm de diâmetro. As células da granulosa, além de formarem uma *corona radiata* bem compactada, apresentam núcleo eucromático e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, denotando alta atividade de síntese. A zona pelúcida aparentemente é menos compacta que a de outras espécies, além disso, é possível observar uma junção celular bem definida. As mitocôndrias e as gotículas de lipídeo estão distribuídas uniformemente no ooplasma, enquanto os grânulos corticais podem ser visíveis próximos do oolema.

O aumento do diâmetro folicular (2mm) é acompanhado pela formação do espaço perivitelínico (Figura 2 – Anexo 2), pelo deslocamento do núcleo mais para a periferia do oócito e pelo aparente aumento da quantidade de mitocôndrias e grânulos corticais.

Quando foram analisados CCOs oriundos de folículos com 6mm de diâmetro (Figura 3 – Anexo 2) foi observado que as organelas localizam-se próximas ao núcleo, com destaque para o maior desenvolvimento do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático liso. Além disso, as mitocôndrias migraram para a região cortical do oócito enquanto os vacúolos lipídicos migraram para a região central.

Ao analisar oócitos obtidos de folículos antrais de 10mm (Figura 4 – Anexo 2), a modificação mais importante foi a consolidação da redistribuição

das organelas. O retículo endoplasmático liso apresenta-se bastante desenvolvido e as mitocôndrias mostram-se pleomórficas. As microvilosidades do oolema são bastante desenvolvidas e ocupam o espaço perivitelínico.

Assim como observado no Capítulo 1, a ultra-estrutura dos oócitos bubalinos assemelha-se à de outros mamíferos, porém com diferenças importantes que podem refletir-se nas diferenças funcionais observadas na produção *in vitro* de embriões (Neglia et al., 2003) e na dinâmica folicular (Manik et al., 2002a) quando comparados com bovinos europeus ou zebuínos.

No presente trabalho foi feita a inferência que as vesículas presentes em grande quantidade no ooplasma de bubalinos são vacúolos lipídicos principalmente porque não possuem membrana biológica, seu conteúdo pode ter sido removido pelo uso da acetona na desidratação e o aumento de sua quantidade está relacionado com um aumento no retículo endoplasmático liso. Por fim, o alto conteúdo lipídico dos oócitos bubalinos pode ser funcionalmente comprovado, pois a adição de compostos que seqüestram radicais livres no meio de maturação *in vitro* refletem no aumento da produção embrionária (Gasparini et al., 2006).

O fato da zona pelúcida ser descrita como mais porosa e frágil corrobora com os dados de Boni et al (1992), porém discorda do observado em bovinos (Hyttel et al., 1986). Essa característica pode estar associada a um maior risco de transmissão de vírus e bactérias durante a comercialização de material genético feminino.

O aumento da quantidade de “unidades metabólicas” (mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e vacúolos lipídicos) observadas enquanto o

folículo aumenta de diâmetro denota que conforme os oócitos vão desenvolvendo-se, ou seja, preparando-se para o reinício da meiose, sua atividade metabólica se intensifica e seu núcleo também se desloca para a periferia. Além disso, a localização periférica das unidades metabólicas observada em oócitos provenientes de folículos de 10 mm denota alta taxa de troca entre oócito e células da granulosa bem como intensificação da produção de grânulos corticais.

Outra importante característica observada é que conforme o folículo aumenta de diâmetro as células da *corona radiata* diminuem o contato entre si. Essa característica morfológica pode explicar o fato de que CCOs de bubalinos são mais susceptíveis à remoção mecânica das células da granulosa durante os procedimentos de punção folicular (Neglia et al., 2003b)

Principais contribuições

- Determinação do baixo número de folículos pré-antrais (19.819) presentes nos ovários dos bubalinos quando comparado com outros ruminantes;
- Predominância da quantidade de folículos primários em relação aos primordiais e secundários;
- A quantidade de vesículas lipídicas do ooplasma de oócitos inclusos em folículos antrais é maior nos bubalinos que em outras espécies;
- A zona pelúcida é mais porosa que a de bovinos e aparentemente mais frágil;

- A quantidade de unidades metabólicas (mitocôndrias, retículo endoplasmático liso) no ooplasma aumenta conforme o diâmetro do folículo aumenta;
- Conforme o diâmetro do folículo aumenta, as organelas (mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi) e o núcleo migram para a periferia do oócito;
- Diminuição do contato entre células do *cumulus oophorus* e oócito conforme aumenta o diâmetro do folículo;

7. CAPÍTULO 3

Capítulo referente ao trabalho enviado para publicação com o título “Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*)” (ANEXO 3).

O estudo das modificações ultra-estruturais durante a maturação *in vitro* de diferentes espécies resultou em um melhor entendimento da biologia do oócito e permitirá melhorias nos sistemas de maturação e fecundação *in vitro* específicos para a espécie. Diante disso o presente capítulo visa estabelecer as mudanças ultra-estruturais que ocorrem nos oócitos bubalinos durante o período de maturação *in vitro*.

Objetivo Específico:

- Estudar os eventos ultra-estruturais associados à maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bubalinos *in vitro*, além da interação oócito-células do *cumulus oophorus*.

Materiais e Métodos

Animais: Os experimentos foram realizados entre julho e novembro, na fazenda experimental da Faculdade de Medicina Veterinária da UPIS em Planaltina – DF. As 10 fêmeas que foram submetidas à punção folicular possuíam entre 2 e 4 anos de idade com peso médio de 360 Kg e escore

corporal entre 2 e 3 (em uma escala de 1 a 5; Moreira et al., 2000). Antes do início das seções de punção folicular os ovários dos animais foram avaliados por ultra-sonografia e a onda folicular zerada com o uso de implante de progesterona e benzoato de estradiol.

Punção folicular guiada por ultra-sonografia: Os animais receberam anestesia epidural e o procedimento foi realizado com equipamento Aloka SSD-500, com sonda micro convexa de 5 MHz, acoplada a um suporte vaginal com agulha de aspiração. Os CCOs coletados foram classificados sob estereomicroscópio e somente estruturas consideradas qualidade I e II (Gupta et al., 2002) foram utilizadas.

Experimento 1 – *Modificações ultra-estruturais durante maturação in vitro:* Oitenta e cinco oócitos foram maturados em meio TCM 199 com sais de Earle, suplementado com 10% de SFB, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), L-glutamina, penicilina e estreptomicina. Os CCOs selecionados e separados em grupos de 10 a 15 foram transferidos para gotas de 150µl do mesmo meio, cobertas com óleo mineral (AMRESCO®), previamente estabilizadas por duas horas em incubadora à 38,5°C e 5% de CO₂, com umidade saturada. Seis a oito estruturas foram removidas das gotas de maturação 0,6,12,18 e 24 após o início do processo.

Preparação dos CCOs para microscopia eletrônica de transmissão: fixados em solução de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,2) a 4°C por 24 horas. Conforme descrito por Hyttel e Madsen (1987), antes da pós-fixação as estruturas foram incluídas em 4% de ágar bacteriológico. A pós-fixação foi

realizada com tetróxido de ósmio. Após isso, o material foi contrastado *in block* com acetato de uranila 0,5% e desidratado com acetona. Para a realização dos cortes semi-finos (2 μ m), as porções de tecido foram incluídas em resina Spurr. Esses cortes foram corados com azul de toluidina para observação do núcleo o oócito (região equatorial). Os cortes ultrafinos (90nm) foram feitos dos CCOs com núcleo intacto e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, para serem analisados no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011), operado à 80 Kv.

Experimento 2 – *Produção in vitro de embriões*: Cento e dezoito estruturas foram maturadas por 24 horas seguindo a mesma metodologia descrita no experimento 1.

A *Fecundação in vitro (FIV)* foi realizada em meio composto de 40 μ l de PHE (Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina) e 10 μ l de heparina, para cada 900 μ l de meio de fecundação. O número de oócitos e o tamanho da gota de fecundação permaneceram o mesmo do período de maturação. O sêmen utilizado foi proveniente de um mesmo reprodutor e da mesma partida. O processo de separação espermática foi realizado pelo método do gradiente percoll (1 mL de percoll 90% sob 1 mL de percoll 45%). A dose inseminante foi ajustada para 2 milhões de espermatozóides/mL na gota, segundo sugerem Gasparrini et al., (2008). Os espermatozóides e os CCOs foram co-incubados por 18 horas à 38,5°C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, sendo considerado o dia da inseminação como dia zero (D0).

O *Cultivo in vitro de embriões* foi realizado em meio SOF (fluido de oviduto sintético), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais,

tri-citrato de sódio, nyo-inositol e 5% de soro fetal bovino (SFB) a 38,5°C e 5% CO₂ em ar. Os prováveis zigotos permaneceram em cultivo por 8 dias. As taxas de clivagem foram avaliadas em D2 (segundo dia após a fecundação). Além disso, os embriões foram avaliados em D6 e D7 para determinar a taxa de mórulas e blastocistos, respectivamente, e em D8 para verificar a taxa de eclosão.

Resultados e Discussão

Experimento 1 – Modificações ultra-estruturais durante maturação in vitro: A Figura 1 do Anexo 3 corresponde a um CCO imaturo obtido de um folículo antral. O núcleo do oócito está localizado na periferia e, assim como, o das células da granulosa está eucromático. As células da granulosa estão bem compactas e as mitocôndrias do oócito estão em sua região cortical, porém a maioria do ooplasma é ocupada por vacúolos lipídicos coalescentes. A ultra-estrutura descrita é condizente com os dados previamente publicados para a espécie, bem como para bovinos (Nagano et al., 2006), ovinos (O'Brien et al., 2005) e camelos (Kafi et al., 2005). Assim como em todas as fases da foliculogênese a principal característica dos oócitos bubalinos é a grande quantidade de gotículas lipídicas no ooplasma.

Após seis horas de maturação (Figura 2 – Anexo 3), o espaço perivitelínico próximo ao núcleo apresenta-se aumentado e com poucas microvilosidades, diferente do resto da estrutura. As organelas não apresentam mudanças significativas, porém a relação entre as células da granulosa e a zona

pelúcida ficou menos intensa, denotando que provavelmente essas células não tem papel importante na maturação do oócito no resto do período de maturação. Essa separação provavelmente é causada pela produção de ácido hialurônico induzida pelas gonadotrofinas (Chen et al., 1990) presentes no meio de maturação.

Após 12 horas de maturação *in vitro* (Figura 3 – Anexo 3) o primeiro corpúsculo polar foi liberado para o espaço perivitelínico, representando que o oócito atingiu o estágio de metáfase II. Esse dado difere de outros trabalhos que descrevem a extrusão do corpúsculo polar em momentos posteriores da maturação (Santos et al., 2002; Nandi et al., 2002). Além disso, é importante notar a modificação do aspecto das gotículas de lipídeo, provavelmente denotando uma alteração química nas moléculas lipídicas. Essa alteração é comprovada quando se observa um aumento na quantidade e qualidade dos embriões produzidos com o uso de compostos que aumentam a síntese de glutatona durante a maturação *in vitro* (Gasparrini et al., 2000; 2006).

Está apresentada na Figura 4 do Anexo 3 a região periférica de um oócito maturado *in vitro* por 18 horas onde as gotículas de lipídeo se mantêm escuras e são visualizados diversos grânulos corticais.

No final do período de maturação (24 horas), é possível observar (Figura 5 – Anexo 3) as gotículas de lipídeo grandes e escuras bem como diversos grânulos corticais.

A avaliação ultra-estrutural de oócitos imaturos de bubalinos e bovinos evidencia que agrupamentos de mitocôndria e complexos de Golgi localizados na periferia da célula são características comuns as espécies. Assim sendo essa

característica pode ser usada como marcador para a competência oocitária pois essa distribuição de organelas só é observada em oócitos originados de folículos antrais maiores conforme descrito no Capítulo 2. Somando a isso, ainda é possível inferir que esses complexos funcionais estão envolvidos com a síntese de grânulos corticais.

Experimento 2 – Produção *in vitro* de embriões: Inicialmente é importante ressaltar que os animais submetidos a punção folicular não possuíam corpo lúteo nos ovários, caracterizando anestro estacional. A Tabela 1 do Anexo 3 demonstra uma queda no número médio de CCO coletados de 8,3 para 3,9 estruturas por animal da 1ª para a 2ª.OPU, bem como no percentual de estruturas viáveis. A mesma tabela também mostra grande variação individual o que provavelmente seja uma consequência da variação também observada no número de folículos pré-antrais descritos no Capítulo 2. A quantidade de estruturas coletadas é inferior a observada em bovinos e reflexo da quantidade menor de folículos nos ovários das búfalas (Drost, 2007b). Quando os dados da Tabela 1 do Anexo 3 são comparados com outras publicações na mesma espécie é possível observar que o número total de estruturas coletadas é ligeiramente superior (Drost, 2007a) e o número de estruturas viáveis é superior a algumas publicações (Baruseli et al., 2007) e inferior a outras (Manjunatha et al., 2008).

Os dados de produção *in vitro* de embriões estão demonstrados na Tabela 2 do Anexo 3, com clivagem de 46,1% e produção de apenas 8,3% de mórulas. A taxa de clivagem obtida assemelha-se a descrita na literatura (Liang et al., 2008), porém o percentual de embriões produzidos é bastante inferior.

Existem dois fatores que provavelmente colaboraram para esse fato: a não utilização de compostos tiol na maturação e a sazonalidade que comprovadamente interfere negativamente na produção *in vitro* de embriões (Manjunatha et al., 2007)

Principais contribuições

- Alto conteúdo lipídico nos oócitos imaturos;
- Aumento do espaço perivitelínico durante a maturação *in vitro*;
- Migração das organelas (complexo de Golgi, mitocôndria) atuando na síntese de grânulos corticais;
- Diminuição do contato entre as células do *cumulus oophorus* e o oócito após seis horas de maturação *in vitro*;
- Alteração das características morfológicas das gotículas de lipídeo citoplasmáticos entre 6 e 12 horas de maturação *in vitro*;
- É possível produzir *in vitro* embriões bubalinos na contra estação.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os experimentos realizados neste trabalho de tese permitem chegar a algumas conclusões:

O desenvolvimento folicular pré-antral nos bubalinos tem particularidades ultra-estruturais que refletem atividade metabólica distinta mesmo de espécies próximas como bovinos e ovinos. Os gametas e folículos são menores que os bovinos e possuem conteúdo lipídico bastante superior a esses. Além disso, o acúmulo de lipídeo é gradativo, intensificando-se conforme a foliculogênese evolui. Essas características determinam que para o aproveitamento desses gametas são necessários estudos específicos pois a simples adaptação de técnicas já desenvolvidas para outras espécies provavelmente não terá sucesso devido às diferenças descritas.

Conforme já havia sido descrito, a presente tese confirmou o menor número de folículos pré-antrais dos bubalinos. Além disso, há uma predominância de folículos classificados como primários em detrimento dos primordiais e secundários. Outro fator que impacta na aplicação de biotecnologias como a punção folicular, bem como a biosegurança é o fato da zona pelúcida dos oócitos bubalinos ser aparentemente mais frágil e conter mais fendas que a dos bovinos.

Ficou claramente evidenciado nos estudos realizados que a maturação citoplasmática dos bubalinos é caracterizada pela migração de organelas como

mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso bem como o complexo de Golgi para a região cortical do oócito. Somando-se a essa característica o fato do aumento do espaço perivitelínico e a diminuição gradativa do contato entre as células do *cumulus oophorus* e o oócito conforme a maturação evolui.

Por fim, o presente trabalho demonstrou que durante o processo de maturação *in vitro* ocorre modificação do aspecto ultra-estrutural das gotículas de lipídeo do ooplasma de oócitos bubalinos, sugerindo alteração química das moléculas que compõe essas estruturas. Ressalta-se o fato que também foi comprovado que, com as devidas modificações no sistema de produção *in vitro* de embriões, é possível obter-se embriões viáveis de búfalas, mesmo na contra estação.

Como perspectivas, pode ser afirmado que os dados descritos nessa tese servem de base para estudos que visem o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para aumentar o número de descendente de fêmeas bubalinas geneticamente superiores ao invés da aplicação direta de modelos desenvolvidos para bovinos.

9. BIBLIOGRAFIA

- ADDEO, F.; MUCCHETTI, G., Present status and future prospects of water buffalo cheese from Italy. In: **Anais VI World Buffalo Congress**, Maracaibo, Venezuela, p. 49-61, 2001.
- AGARWAL., S.K.; PURBEY, L.N. Oestrus behaviour and its relation to conception in rural buffaloes. **Indian Vet. J.**, v.60, p. 631–636, 1983.
- ALEXIEV, A. Buffalo production systems in Europe and the neighboring region. In: **Anais VI World Buffalo Congress**, Maracaibo, Venezuela, p. 62-73, 2001.
- AWASTHI MK, KAVANI FS, SIDDIQUEE GM, SARVAIYA NP, DERASHRI HJ. Is slow follicular growth the cause of silent estrus in water buffaloes?. **Anim Reprod Sci**, v. 99, 258-268, 2007.
- BARUSELLI P.S.; CARVALHO N.A.T.; HENRIQUEZ C.E.P.; AMARAL., R.; NICHI, M.; REICHERT, R.H. Use of progesterone associated to “Ovsynch” protocol for timed artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: **Anais 2nd Congresso Nazionale Sull’Allevamento Del Buffalo**, Roma, Itália, v. 1, p. 265-268, 2003a.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; FERRAZ, M. L.; BARNABE, R. C. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial., **Rev. Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 3, p. 285-292, 2007.
- BARUSELLI, P.S. Sexual behaviour in buffaloes. In: **Anais IV WORLD BUFFALO CONGRESS**, São Paulo, Brasil, v. 1, p. 158-173, 1994.

- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T. Controle do desenvolvimento folicular para o emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v. 27, n.2, p. 94-102, 2003.
- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T. REPRODUCTIVE MANAGEMENT, Artificial insemination and embryo transfer in buffalo. In: **Anais II Simpósio de Búfalos das Américas**, CD-ROM, Corrientes, Argentina, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; CAVALCANTE, A.K.S.; NICHI, M.; ZICARELLI, L. Use of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: **Anais 2nd Congresso Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo**, Roma, Itália, v. 1, p. 269-273, 2003b.
- BARUSELLI, P.S.; HENRÍQUEZ, C.E.P. **Reprodução em búfalos**. São Paulo, 2004. Disponível em <<http://www.fmvz.usp.br/bufalos/>>. Acesso em 07 de maio de 2004.
- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; VISINTIN, J.A., BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; AMARAL., R. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v.23, p.360-362, 1999.
- BARUSELLI, P.S.; MUCCIOLO, R.G.; VISINTIN, J.A.; VIANA, W.G.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; OLIVEIRA, C.A.; MOLERO-FILHO, J.R. Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.47, p. 1531-1547, 1997.

- BARUSELLI, P.S.; OLIVEIRA, J.F.S.; MENDES, M.L.M.; JORGE, A.M.; FUJII, T.; PALAZZO, J.P.C. Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Campinas. **Documento Técnico CATI**, v.94, 16p., 1993.
- BAYRAK, A., OKTAY, K.,. The expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p15, p16, p21, and p27 during ovarian follicle growth initiation in the mouse. **Reprod. Biol. Endocr.** 41, <http://www.rbej.com/content/1/1/41>, 2003.
- BERBER, R.C.A.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. Synchronization of ovulation for artificial insemination at a fixed time with GnRH and LH (Partial results). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS** (Suplemento), v.27, p.205, 1999.
- BITTMAN EL, KARSCH FJ. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day lengths in the ewe. **Biol Reprod**, v. 30, p. 585–593, 1984.
- BONI R, ROVIELLO S, GASPARRINI B, LANGELLA M, ZICARELLI L. In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo Journal.*, v. 1: p. 115- 120, 1999.
- BONI, R., SANTELLA, L., DALE, B., ROVIELLO, S., DI PALO, R., BARBIERI, V. Maturazione in vitro di oociti buffalini: indagine ultrastrutturale. **Acta Med. Vet.**, v. 38, p. 153–161, 1992.
- BONI, R.; ROVIELLO, S.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI L. Pregnancies established after transferring embryos yielded by ovum pick-up and in vitro embryo production in Italian buffalo cows. In: **Anais V World Buffalo Congress**, Caserta, Itália, p.787-792, 1997.

- CAHILL LP, MARIANA JC, MAULÉON P,: Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **J. Reprod. Fertil.**, v. 55, p. 27– 36, 1979.
- CAMPANILE G, DI PALO R, NEGLIA G, VECCHIO D, GASPARRINI B, PRANDI A, GALIERO G, D'OCCHIO MJ. Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. **Theriogenology**, v. 67, p. 1393-1398, 2007.
- CARVALHO, N.A.T. **Uso do agonista de GnRH deslorelina, associado ao LH, para a superovulação de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*)**. 2001, 68p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2001.
- CARVALHO, N.A.T.; REICHERT, R.H.; NICHI, M.; HENRIQUEZ, C.E.P.; OLIVEIRA, C.A.; BARUSELLI, P.S. Use of hCG to timed artificial insemination in buffalo. In: **Anais 15th International Congress on Animal Reproduction**, Porto Seguro, Brasil, 2004.
- CECCONI S, BARBONI B, COCCIA M, MATTIOLI M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biol Reprod**, v.60, p.594-601, 1999.
- CHEN L, WERT SE, HENDRIX EM, RUSSEL PT, CANNON M, LARSEN WJ. Hyaluronic acid synthesis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. **Mol Reprod Dev**, v. 26, p. 236-247, 1990.
- DANELL, B. **Oestrous behavior, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers**. 1987. PhD thesis, Dept. of Obs. Gyn., Faculty of Vet. Med., Swedish Univ. Agri. Sci. Uppsala, Sweden. 1987.

- DE MATOS, D.G., FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, 53(3), 761-771, 2000.
- DE MATOS, D.G., FURNUS, C.C., MOSES, D.F., MARTINEZ, A.G., MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, 45, 451-457, 1996.
- DE RENSIS F, LÓPEZ-GATIUS F. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Theriogenology**, v. 67, p. 209-216, 2007.
- DROST, M. Advanced reproductive technology in the water buffalo. **Theriogenology**, v. 68, p. 450-453, 2007a.
- DROST, M. Bubaline versus bovine reproduction. **Theriogenology**, v. 68, 447–449, 2007b.
- DROST, M.; WRIGHT, J.M. JR.; CRIPE, W.S.; RICHTER, A.R. Embryo transfer in water buffalo *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 20, p. 579–584, 1983.
- EL-WISHY AB. The postpartum buffalo. II. Acyclicity and anestrus. **Anim Reprod Sci**, v. 97, p. 216-236, 2007.
- EL-WISHY, A.B.; ABDU, M.S.S.; HEMOUDAS, N.; EL SAWAY, S.A. Reproduction in buffaloes in Egypt: morphological features of the ovaries of cattle and buffaloes in relation to their function. **Z. Tierz. Zuechtungsbiol**, v. 88, p. 47–63, 1971.

- EPPIG, J.J., O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. **Biol Reprod**, v.54, p.197-207, 1996.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, v. 25, p. 800–805, 1966.
- FADLE, W.S.A.; FAHMY, M.F.A.; EL SHAFEY, S.M. Histological studies on the ovaries of Egyptian buffaloes with special reference to the corpus luteum. **Zentralbl. Veterinaermed.**, v. A-21, p. 581–591, 1974.
- FAIR T, HYTTEL P. Oocyte growth in cattle—ultrastructure, transcription and developmental competence. **Microsc. Reprod. Dev.: A Dynamic Approach**, v.12, p. 109– 118, 1997.
- FAIR, T., HULSHOF, S.C.J., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M.. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anat. Embryol.**, v. 195, p. 327–336, 1997.
- FAO. **FAOSTAT**, 2006. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/409/default.aspx>>. Acesso em 31 de outubro de 2006.
- GASPARRINI B, BOCCIA L, MARCHANDISE J, DI PALO R, GEORGE F, DONNAY I, ZICARELLI L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v. 65, p. 275-287, 2006:
- GASPARRINI B, DE ROSA A, ATTANASIO L, BOCCIA L, DI PALO R, CAMPANILE G, ZICARELLI L. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency on in vitro embryo development in Italian

- Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Anim Reprod Sci**, v. 105, p.354-364, 2008.
- GASPARRINI B., BOCCIA L., DE ROSA A., VECCHIO D., DI PALO R., ZICARELLI L. In vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of media and sperm motility inducing agents. **Proc of the Annual Conference of IETS, Portland, Oregon**, 10-13 Jan 2004.
- GASPARRINI B.; NEGLIA G.; DI PALO R.; CAMPANILE G.; ZICARELLI L. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, v. 54, p. 1537-1542, 2000
- GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology*, 57 (1), 237-256, 2002.
- GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.87, p.223-30, 1989
- GOUGEON A, CHAINY GBN. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **J. Reprod. Fertil.**, v. 81, p. 433– 442, 1987.
- GUPTA, P.S.P., RAMESH, H.S., MANJUNATHA, B.M., NANDI, S., RAVINDRA, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, p.57-63, 2008.
- GUPTA PSP, RAVINDRANATHA BM, NANDI S, SARMA PV. *In vitro* maturation of buffalo oocytes with a epidermal growth factor and fibroblast growth factor. **Ind J Anim Sci**, v. 72, p. 23-26, 2002.

- GUTIERREZ CG, RALPH JH, TELFER EE, WILMUT I, WEBB R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. **Biol Reprod**, v. 62, p. 1322-1328, 2000.
- HUANMIN Z, YONG Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v.54, p. 641-650, 2000.
- HYTTEL P, FAIR T, CALLESEN H, GREVE T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23–32, 1997.
- HYTTEL P, MADSEN I. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. **Acta Anat.**, v. 129, p. 12-14, 1987.
- HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 615-625, 1986.
- JEWGENOW K, STOLTE M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats— viability and ultrastructural investigations. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 44, p. 183–193, 1996.
- KACINSKIS MA, LUCCI CM, LUQUE MCA, BÁO SN. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 47, p. 45–57, 2005.
- KAFI M, MESBAH F, NILI H, KHALILI A. Chronological and ultrastructural changes in camel (*Camelus dromedarius*) oocytes during in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 2458-2470, 2005.
- KAMIZI, S.E. Observations on behavioural changes during oestrus in Nili-Ravi buffalo heifers. **Pakistan Vet. J.**, v. 3, p. 88–90, 1983.

- KANAI, Y.; SHIMIZU, H. Characteristics of the estrous cycle of the Swamp buffalo under temperate conditions. **Theriogenology**, v. 19, p. 593–602, 1983.
- KUMAR, A.; SOLANKI, V.S.; JINDAL., S.K.; TRIPATHI, V.N.; JAIN, G.C. Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 47, p. 189–195, 1997.
- LIANG X., ZHANG, X., YANG, B., CHENG, M., HUANG, F., PANG, C., QING, G., LIAO, C., WEI, S., SENATORE, E.M., BELLA, A., PRECISSE, G.A. Pregnancy and calving rates following transfer of in-vitro-produced river and F1 (river x swamp) buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in recipients on natural oestrus or synchronized for ovulation. **Reprod Fertil Dev.**, v. 19, p. 670-676, 2007.
- LIANG, X.W., LU, Y.Q., CHEN, M.T., ZHANG, X.F., LU, S.S., ZHANG, M., PANG, HUANG, F.X., LU, K.H. In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. **Theriogenology**, doi:10.1016/j.theriogenology.2007.11.021, 2008.
- LUCCI CM, AMORIM CA, RODRIGUES APR, FIGUEIREDO JR, BÁO SN, SILVA JRV, GONÇALVES PBD. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Anim Reprod Sci**, v. 56, p. 223–236, 1999.
- LUCCI CM, RUMPF R, FIGUEIREDO JR, BÁO SN. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57,p. 1467-1483, 2002.

- LUCCI CM, SILVA RV, CARVALHO CA, FIGUEIREDO JR, BÁO SN. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rumin. Res.**, v. 41, p. 61–69, 2001.
- MADAN ML, PRAKASH BS. Reproductive endocrinology and biotechnology applications among buffaloes. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 261-281, 2007
- MADAN, M.L. **Status of reproduction in female buffalo**. In: Buffalo Production and Health: a compendium of latest research information based on Indian studies. ICAR publications, New Delhi, India, p. 89-100. 1988.
- MADAN, M.L.; DAS, S.K.; PALTA, P. Application of reproductive technologies to buffaloes. **Anim Reprod Sci**, v. 42, p. 299-306, 1996.
- MADAN, M.L.; RAINA, V.S. Fertility and performance of buffaloes under tropical conditions. In: **Anais 10th Int. Congr. On Anim. Reprod. and Artificial Insemination**, Illinois, Estados Unidos, v. 2, p. 142.1-142.4, 1984.
- MANIK, R.S.; MADAN, M.L.; SINGLA, S.K. Ovarian follicular dynamics in water buffalo (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. **Theriogenology**, v.41, p. 247, 1994.
- MANIK, R.S.; PALTA, P.; SINGLA, S.K.; SHARMA, V. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 14, p. 315-325, 2002a.
- MANIK, R.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P., MADAN, M.L. Ovarian follicular dynamics monitored by real-time ultrasonography during oestrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Asian Aust. J. Anim. Sci.**, v. 11, p. 480-485, 1998.
- MANIK, R.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P.; CHAUHAN, M.S. Ultrasonographic study of ovulation in buffalo following natural estrous and after synchronization of

- estrus by treatment with prostaglandin or norgestomed and estradiol valerate. **Indian Journal of Animal Science**, v. 72, p. 145-147, 2002b.
- MANJUNATHA BM, GUPTA PSP, RAVINDRA JP, DEVARAJ M, RAMESH HS, NANDI S.
In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 68, p. 882-888, 2007.
- MANJUNATHA, B.M.; RAVINDRA, J.P.; GUPTA P.S.P.; DEVARAJ, M.; NANDI, S.
Oocyte Recovery by Ovum Pick Up and Embryo Production in River Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Reprod Domest Anim** doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00939.x, 2008.
- McCOOL, C.J.; Carney, J.V.; Jayawardhana, G.A.; Wolfe, S.G.; Simpson, M.; Oem, T.
Oestrus detection in oestrus-synchronized Swamp buffalo under semi-extensive management conditions. **Buffalo J.**, v. 155–168, 1989.
- MEHMOOD A, ANWAR M, SAQLAN NAQVI SM. Capacitation of frozen thawed buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa with higher heparin concentrations. **Reprod Domest Anim**, v. 42, p. 376-379, 2007.
- MISRA, A.K.; KASIRAJ, R.; MUTHA RAO, M.; RAGAREDDY, N.S.; JAISWAL., R.S.; PANT, H.C. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 50, p. 637-649, 1998.
- MOREIRA FC, RISCO MFA, PIRES JD, AMBROSE M, DROST M, DELORENZO WW.
The effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology**, v. 53, p. 1305-1319, 2000.

- NAGANO M, KATAGIRI S, TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential., **Zygote**, v. 14, p. 53-61, 2006.
- NANDI S, CHAUHAN MS, PALTA P. Effect of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus Bubalis*) oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, 50: 1251-1262, 1998.
- NANDI S, RAVINDRANATHA BM, GUPTA PSP, SARMA PV. Timing of sequential changes in cumulus cells and first polar body extrusion during in vitro maturation of buffalo oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1151-1159, 2002.
- NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; DI PALO, R.; CAMPANILE, C.; PRESICCE, G.A.; ZICARELLI, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1123-1130, 2003b.
- NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. First pregnancies to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced in vitro. In **Anais LVII Convegno S.I.S.VET.**, Ischia, Napoli, Italy, p. 445–446, 2003a.
- NEGLIA, G.; MARINO, M.; DI PALO, R.; WILDING, M.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; DALE, B.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L. A comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus Bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. **Theriogenology**, v. 55, p 488, 2001.

- NICOSIA, S.V., EVANGELISTA, I., BATTA, S.K. Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. **Biol. Reprod.**, v. 13, p. 423–447, 1975.
- O'BRIEN JK, DWARTE D, RYAN JP, MAXWELL WM, EVANS G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. **Reprod Fertil Dev.**, v. 8, p. 1029-1037, 2005.
- O'BRIEN M.J., PENDOLA J.K., EPPIG J.J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biol Reprod**, v.68, p.1682-1686, 2003.
- OCAMPO, M.B.; DE ASIS, A.T., OCAMPO, L.C., KANAGAWA, H., Histological observation of follicular atresia in Swamp buffalo. **Buffalo Bull.**, v. 13, p. 51–55, 1994.
- PAWSHE CH, TOTEY SM. Effects of cumulus cells monolayer on *in vitro* maturation of denuded oocytes of buffalo (*Bubalus Bubalis*). **Theriogenology**, v. 39, p. 281, 1993.
- PERREAULT, S.D., BARBEE, R.R., SLOTT, V.I. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Developmental Biology**, 125, 181-186, 1988.
- ROCHA LOURES, R. Buffalo production system in americas. In: **Anais VI World Buffalo Congress**, Maracaibo, Venezuela, p. 74-86, 2001.
- ROY, D.J., MULLICK, D.N., Endocrine functions of corpus luteum of buffaloes during estrus cycle. **Endocrinology**, v. 75, p. 284–287, 1964.

- SÁ FILHO MF, CARVALHO NAT, GIMENES LU, TORRES JÚNIOR JF, GARCIA JM, TONHATI H, GASPARRINI B; BARUSELLI PS. Efeito do bST na população folicular, na qualidade oocitária e na taxa de recuperação *in vivo* de oócitos em fêmeas bubalinas. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal.**, v. 16, 2005.
- SAMAD, H.A, NASSERI, A.A., A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. In: **Anais** 13th FAOrSIDA Int. Course on Anim. Reprod., Uppsala, Sweden, 1979.
- SANTOS SSD, DANTAS JK, MIRANDA MS, OHASHI OM. Cinética da maturação nuclear in vitro de oócitos bubalinos. *Braz J Vet Res Anim Sci* v. 39, p. 266-270, 2002.
- SANTOS SS, BIONDI FC, CORDEIRO MS, MIRANDA MS, DANTAS JK, FIGUEIREDO JR, OHASHI OM. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Anim Reprod Sci**, v. 95, p. 1-15, 2006.
- SHI D, LU F, WEI Y, CUI K, YANG S, WEI J, LIU Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biol Reprod**, v. 77, p. 285-291, 2007
- SHIMIZU, H. Embryo collection in the Swamp buffalo *Bubalus bubalis* . In **Anais** Int. Seminar on Milk Buffalo Reprod., Islamabad, Pakistan, 1987.
- SINGH, J., NANDA, A.S., ADAMS, G.P. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 593-604, 2000

- SNEL-OLIVEIRA, M.V., BLUME, H., MONDADORI, R.G., SILVA, A.F. O Uso de homeopatia (Estrógeno CH 200) no tratamento superovulatório de búfalas: resultados preliminares. **Anais Zootec**, Brasília, Brasil, CD-ROM, 2004.
- TY, L.V., CHUPIN, D., DRIANCOURT, M.A., Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 19, p. 171–178, 1989.
- VALE, W.G., RIBEIRO, H.F.L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Rev Bras Reprod Anim*, v.29, p.63-73, 2005.
- 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.L., RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 1003–1011, 1996.
- VITTORIA, A., Anatomy of the female genital tract in the buffalo. In: **Anais Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes**, Caserta, Italy, p. 15-20, 1997.
- WU J, BENJAMIN RE, CARRELL DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol Reprod**, v.64, p.375-381, 2001.
- ZAMBONI, L. Fine morphology of the follicle wall and follicle cell–oocyte association. **Biol. Reprod.**, v. 10, p. 125–149, 1974.
- ZICARELLI, L., ESPÓSITO, L., CAMPANILE, G., DI PALO, R., ARNSTROM, D.T. Effect of using vasectomized bulls in AI practica on the reproductive

efficiency of Italian buffalo cows. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 171-180, 1997a.

ZICARELLI, L., GASPARRINI, B. Advances in buffaloes reproduction. In: **Anais II Simpósio de Búfalos das Américas**, CD-ROM, Corrientes, Argentina, 2004.

ZICARELLI, L., NEGLIA, G., CARACCILO DI BRIENZA, V., PAPACCIO, G., ESPOSITO, L., GASPARRINI, B. Buffalo (*Bubalus bubalis*) in vitro embryo production in two different defined culture media. **International Journal of Animal Science**, v. 18-20, p. 136-138, 2003.

ZICARELLI, L.; DE FILIPPO, C. FRANCILO, M.; PACELLI, C.; VILLA, E. Influence of insemination technique and ovulation time on fertility percentage in synchronized buffaloes. **Anais V World Buffalo Congress**, Caserta, Itália, p.732-737, 1997b.



Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles

R.G. Mondadori^{a,b,*}, M.C.A. Luque^a, T.R. Santin^b, S.N. Bão^a

^a Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^b Animal Reproduction Laboratory, Department of Veterinary Medicine, UPIS—Faculdades Integradas, SEPS 712/912, Brasília, DF 70390-125, Brazil

Received 22 November 2005; accepted 17 February 2006

Available online 31 March 2006

Abstract

The main objective of the present study was to characterize buffalo preantral ovarian follicles. Parts of ovarian cortex, collected from postpubertal buffalo females that were having estrous cycles at regular intervals, were selected under stereomicroscopy and processed for optic and transmission electron microscopy. Primordial follicles were characterized as an oocyte encircled by one layer of flattened cells. The buffalo primordial follicle has a mean diameter of 35 μm and the oocyte diameter is 24.9 μm . The oocyte nucleus is relatively large and eccentric; and in the cytoplasm a large amount of mitochondria, vesicles and endoplasmic reticulum cistern, mainly of the smooth type is observed. The primordial follicles cells are rich in plasma membrane invaginations, which are observed within the cell and between the cell and the oocyte. The primary follicles (mean diameter of 41.8 μm) consist of an oocyte, with a medium diameter of 26.9 μm , surrounded by one layer of cubical granulosa cells. At this follicular stage, the beginning of zona pellucida deposition can also be seen in areas between the oocyte and follicular cells. The secondary follicles, which are surrounded by more than one layer of cubical cells, have a diameter of 53.3 μm , and the oocyte has a mean diameter of 29.4 μm . The ultrastructural analysis showed a large amount of coalescent vesicles, more evident in the oocyte periphery. The zona pellucida (ZP) is thicker at this stage and contains a large quantity of glycoproteins. In general, the ultrastructure of buffalo preantral follicles was similar to that of other mammalian species, but some differences were observed, which indicate species specific characteristics. The main differences observed were cytoplasmic vesicles quantity, mitochondria shape and inner content, ZP deposition and granulosa cell–oocyte junctions. In conclusion, the morphological differences described in this paper, could be responsible for some functional differences observed in *Bubalus*

* Corresponding author. Tel.: +55 61 34889902; fax: +55 61 34889907.
E-mail address: mondadori@upis.br (R.G. Mondadori).

bubalis in vitro embryo production and follicular dynamics, when compared with *Bos taurus* or *Bos indicus* species.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Buffalo; Transmission electron microscopy (TEM); Primordial follicle; Primary follicle; Secondary follicle

1. Introduction

The bubalines occupy specific market niches all over the world, producing milk, meat and work power. In the last 30 years, the bubaline world population (172,263,305) has increased 34%, while, in the same period, the cattle population has grown 12% (FAOSTAT, 2004). Since 1973, the world buffalo milk production increased 200% (Rocha Loures, 2001).

In the growing world buffalo population, there are animals with greater genetic value to milk and meat production than other contemporaries. The genome of these animals must be multiplied by the use of reproductive technologies such as artificial insemination, embryo transfer, and in vitro embryo production (Baruselli and Carvalho, 2003).

The buffalo productivity is mainly impacted by the female reproductive efficiency. These animals, compared with cows, have a later puberty, are short day seasonal breeders (Baruselli et al., 1993) and a longer gestation period (Madan and Raina, 1984; Madan, 1988). Other negative factors are the preantral follicles population in the buffalo female ovaries which is estimated to be 19,000 structures (Samad and Nasser, 1979). This number is almost 10 times less than in cattle (Erickson, 1966), and it is probably the main cause of a lesser number of antral follicles in the female buffalo as compared with many other species (Manik et al., 2002).

To increase our knowledge of preantral follicle development in buffalo ovaries, the aim of the present study is to describe the morphological and ultrastructural aspects of ovarian follicular development during the preantral phases in the adult buffalo ovary. Oocyte and granulosa cells of primordial, primary and secondary follicles were studied using light and transmission electron microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Ovaries

Approximately 20 ovaries were obtained from 10 slaughtered healthy postpubertal age buffalo females. The animal's age ranged from 7 to 10 years, and the animals were postpubertal with estrous cycles at typical intervals before slaughter. The structures were maintained, for no more than 2 h, at 30 °C in 0.9% saline solution, enriched with 200 IU/mL of penicillin and 200 µg/mL of streptomycin. After washing in the same solution, the ovaries were transferred to a PBS (phosphate buffered saline) solution, containing 5% FCS (fetal calf serum) and 200 IU/mL of penicillin and 200 µg/mL of streptomycin. Small portions of ovarian cortex were dissected under stereomicroscope.

2.2. Classical histology tissue preparation

Ovarian portions were fixed in Bouin fixative for 24 h, dehydrated in ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin. Sequential sections (5 µm thick) were cut, stained with hematoxylin eosin, and covered with a cover slip.

2.3. Transmission electron microscopy tissue preparation

The ovarian cortex portions were fixed in Karnovsky solution (2% of glutaraldehyde, 2% of paraformaldehyde, 3% of sucrose, in a 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2) at 4 °C for 24 h. The post-fixation was performed with osmium tetroxide. The material was then contrasted in block with uranyl acetate 3% and the tissue was dehydrated with acetone. To utilize the semi-thin sections (2 µm), the tissue blocks were included in Spurr. To classify the preantral follicles, the sections were dyed with toluidine blue and observed under light microscopy. The ultrathin sections (90 nm) were made from follicles with intact nucleus and were contrasted with uranyl acetate and lead citrate to be observed with transmission electron microscopy (Jeol 1011) operated at 80 Kva.

2.4. Follicular analysis

For histological description, preantral follicles were classified as primordial, primary or secondary according to the shape and number of layers of granulosa cells. The histological sections used in the present study were taken from fragments of 10 ovaries, collected from 10 different buffalo females. Each fragment was obtained by a transversal cut in the central region of the ovary and only one histological section per ovary was used for the results. Follicular and oocyte diameters were measured using an ocular micrometer at the oocyte equatorial region, with the presence of oocyte nucleus. To determine the number of granulosa cells surrounding the follicle, the nuclei were counted in the follicle equatorial region. Follicles that contained pyknotic bodies in granulosa cells, condensed oocyte nucleus, shrunken oocyte or low cellular density were considered naturally degenerated (atretic follicles) and, therefore, were not used for the morphometric characterization.

For description by transmission electron microscopy, the characteristics of oocyte and granulosa cell nuclei, cytoplasm, organelles, basal membrane and zona pellucida (ZP) were observed. Only those follicles with normal morphology on semi-thin sections were ultrastructurally evaluated.

2.5. Statistical analysis

Data were treated by analysis of variance, using follicle type as a fixed effect and follicle and oocyte diameters as dependent variables. The means were compared using the Tukey test. The regression analysis was performed considering the follicle diameter in relation to oocyte diameter. All statistical analyses were conducted using SAS System for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Morphometry and light microscopy

Primordial follicles consisted of an oocyte surrounded by one layer of flattened or flattened-cuboidal granulosa cells (Fig. 1A). In primary follicles, the oocyte was surrounded by one layer of cuboidal granulosa cells (Fig. 1B). Initial secondary follicles are characterized by the beginning of granulosa cell bilayer formation, and it was noted that layer duplication is very irregular (Fig. 1C). Secondary follicles consisted of an oocyte surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells. The morphometric data for primordial, primary and secondary follicles are presented in

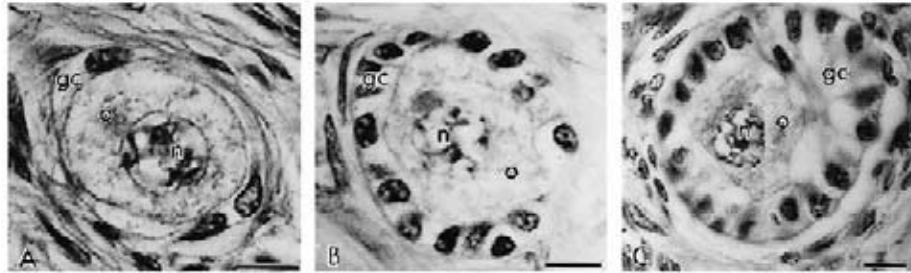


Fig. 1. Light micrographs showing (A) primordial, (B) primary, and (C) secondary buffalo follicles. o, oocyte; n, oocyte nucleus; gc, granulosa cell. Bar = 10 µm.

Table 1

Follicle and oocyte diameter of primordial, primary, and secondary buffalo follicles (mean ± S.D.)

Follicular classes	N	Follicle diameter (µm) (range)	Oocyte diameter (µm) (range)
Primordial	17	35.0 ± 3.11 a (29–39)	24.9 ± 3.69 a (19–26)
Primary	57	41.8 ± 4.83 b (38–55)	26.9 ± 3.84 a,b (17–31)
Secondary	23	53.3 ± 12.04 c (38–75)	29.4 ± 5.39 b (21–36)

Values with different letters (a–c) differ within column ($P < 0.05$).

Table 1. The number of each class of follicles presented in Table 1 is the total number used for measurement. The number of primordial and secondary follicles in the ovary is less than the number of primary follicles (Table 1). There was a highly significant linear regression, considering the follicle as dependent variable (Fig. 2). The equations for primordial, primary and secondary follicles were, respectively, $y = 0.6013x + 20.075$; $y = 0.8245x + 19.617$ and $y = 1.8142x + 0.0525$.

3.2. Primordial follicle ultrastructure

The ovoid to spherical oocyte of the primordial follicles was surrounded by 4–8 flattened granulosa cells at the equatorial section (Fig. 1A). In general, a large number of vesicles with different diameters and containing undefined material were observed in the ooplasm. The oocyte nucleus occupied a central or eccentric position and the cytoplasmic organelles were concentrated

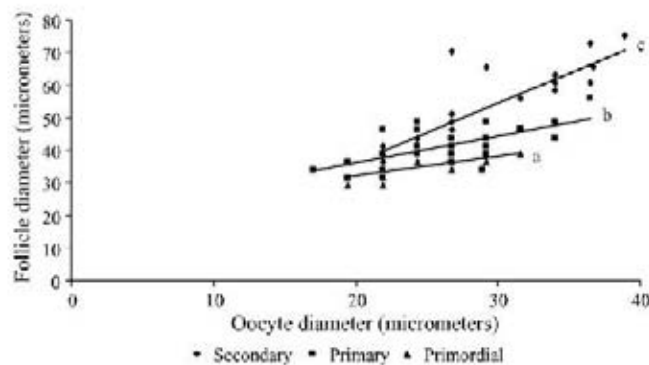


Fig. 2. Scatter chart showing the relation between oocyte and follicle diameter. The tendency lines for primordial (a), primary (b) and secondary (c) follicles are also represented.

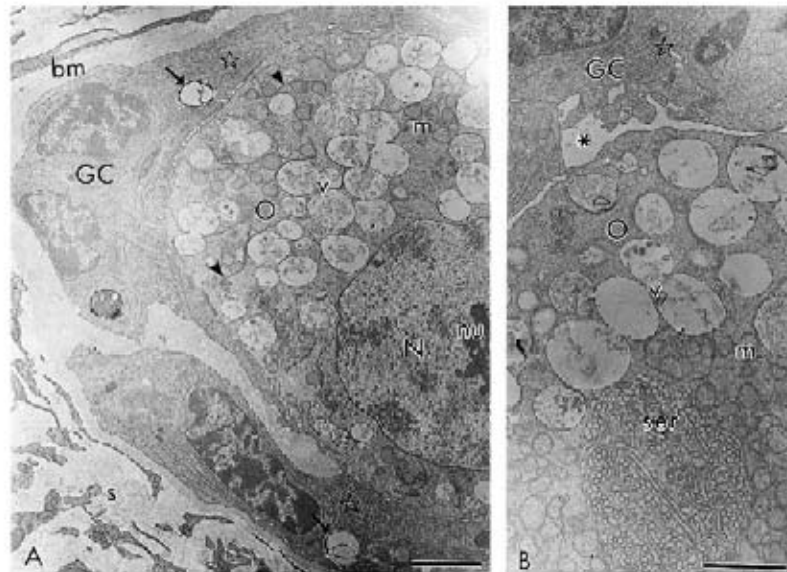


Fig. 3. Primordial follicle (TEM). Note the abundance of vesicles (v), the well developed smooth endoplasmic reticulum (ser), the myelin figures (arrows) and granulosa cell rough endoplasmic reticulum (open star). s, stroma; bm, basal membrane; GC, granulosa cell; O, oocyte; N, nucleus; nu, nucleolus; m, round shaped mitochondria; oocyte endoplasmic reticulum (arrowhead); †: zona pellucida space. Bar = 0.4 μm (A); 0.2 μm (B).

between the vesicles and scarce myelin figures. These figures were observed in granulosa cell cytoplasm (Fig. 3A). The mitochondria were predominantly round with transversal cristae, and in some cases mitochondria that appears to be dividing in two or three were observed. Rough endoplasmic reticulum cisternae were observed in most cases in association with oocyte mitochondria, but were also seen isolated within the ooplasm and in the cytoplasm of granulosa cells this organelle was very well developed. In the ooplasm, a delimited region with a well developed smooth endoplasmic reticulum could be observed (Fig. 3B). This characteristic could be seen in all of the oocytes which appeared with a nucleolus, indicating that this feature occurred at the exact equatorial region, i.e. center of the oocyte. The ZP could not be seen at this stage, and the oocyte and granulosa cells appeared only juxtaposed, without any specific junctions. In some regions, between granulosa cells and oocyte there were apparent empty spaces (Fig. 3B).

3.3. Primary follicle ultrastructure

The predominantly spherical oocyte was surrounded by a single layer of 8–20 granulosa cells at the equatorial section (Fig. 1B). Some patches of ZP appeared to be present in a few follicles between the oocyte and the surrounding granulosa cells (Fig. 4A). Embedded in ZP patches, the oolemma contained projections that penetrated in between adjacent granulosa cells. The ooplasm remained full of vesicles and apparently these structures have a greater coalescence rate when compared with primordial follicles (Fig. 4B).

3.4. Secondary follicles

Round mitochondria were still more abundant, and elongated mitochondria were rarely observed. Lipid droplets were observed in the deep cortical region of some oocytes, and dark

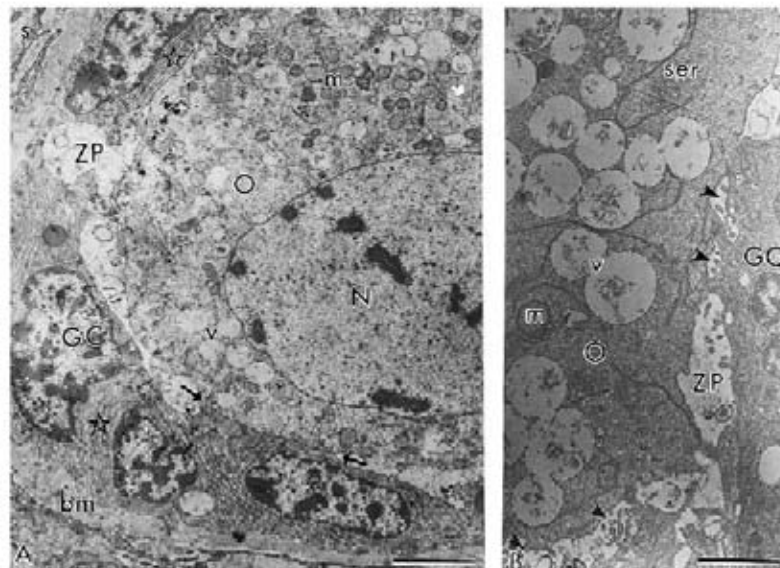


Fig. 4. Primary follicle (TEM). Note the beginning of zona pellucida deposition (ZP), the microvilli embedded (arrow-head) and granulosa cell rough endoplasmic reticulum (open star). Arrows delimit oocyte–granulosa cell membrane juxtaposition. s, stroma; bm, basal membrane; GC, granulosa cell; O, oocyte; N, nucleus; m, round shaped mitochondria; ser, smooth endoplasmic reticulum; v, coalescent vesicles. Bar = 0.4 μm (A); 0.2 μm (B).

granules could be seen within some vesicles (Fig. 5A). Interestingly, in this category, some granulosa cells developed a columnar shape, instead of regular cubical form (Fig. 5B). Patches of ZP material were observed in all structures and were usually associated with erect microvilli. A large amount of coalescent vesicles was observed, sometimes complicating the organelles visualization. Some vesicles appeared to migrate to the oolemma for exocytosis. The myelin figures were more abundant in secondary follicles, oocytes, and granulosa cells (Fig. 6) than in the other developmental stages.

4. Discussion

The growth of the buffalo primordial follicle to the secondary stage is manifested by the proliferation and differentiation of the granulosa cells and an increase in oocyte diameter from approximately 25 to 29 μm . As already described for cattle (Fair et al., 1997), the granulosa proliferation and restructuring are the first morphological features to be noted at primordial follicle activation in buffalo.

The results showed that the mean diameter of buffalo oocytes and follicles, and the mean number of granulosa cells at the equatorial section were less than those observed for European (Hyttel et al., 1997), and Zebu (Kacinskis et al., 2005) cattle in all three developmental stages (i.e., primordial, primary and secondary follicles). In addition, the buffalo follicles and oocyte diameters, in each category, are similar as those described for mice (Bayrak and Oktay, 2003), and greater than that of sheep (Lundy et al., 1999; van den Hurk and Zhao, 2005) and goats (Lucci et al., 2001). As described by van Wezel and Rodgers (1996) for European cattle, the granulosa cells of buffalo follicles are clustered at two opposite poles on the long axis of each structure, giving a prolate shape to the follicle. Besides the follicular renewal described in postnatal mouse ovary

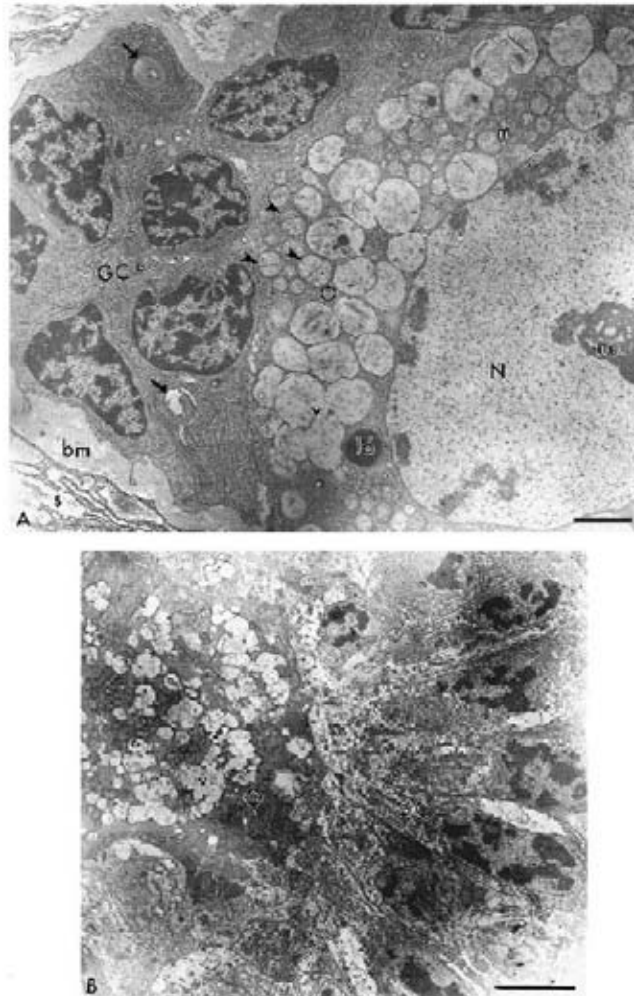


Fig. 5. Secondary follicle (TEM). Note the dividing mitochondria (arrowhead), the columnar granulosa cells in (b) and the myelin figures (arrows). s, stroma; bm, basal membrane; GC, granulosa cell; O, oocyte; N, nucleus; nu, nucleolus; m, round shaped mitochondria; v, coalescent vesicles; ld, lipid droplet. Bar = 0.2 μm (A); 0.4 μm (B).

(Johnson et al., 2004), the lesser overall number of primordial follicles (Table 1) observed in the present study could be explained by buffalo having a longer reproductive life than cows, ewes and goats, and the pool of primordial follicles could be almost exhausted because the slaughtered animals had an advanced age. Moreover, the greater number of primary follicles, compared with primordial and secondary, could be caused by the time required for follicular development from primordial to primary and primary to secondary stages.

In general, the ultrastructure of buffalo preantral follicles was similar to that of other mammalian species (cattle: van Wezel and Rodgers, 1996; Hyttel et al., 1997; Kacinskis et al., 2005; pig: Greenwald and Moor, 1989; feline: Jewgenow and Stolte, 1996; human: Oktay et al., 1997; and goat: Lucci et al., 2001), but some differences were observed, which indicate species specific characteristics. The main differences observed were cytoplasmic vesicles quantity, mitochondria

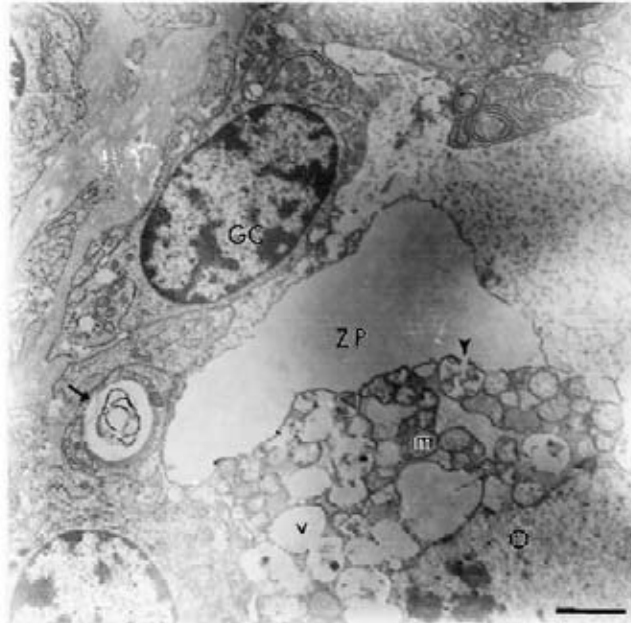


Fig. 6. Detail of secondary follicle (TEM). Note the vesicle exocytosis (arrowhead) and the myelin figures (arrows). GC, granulosa cell; O, oocyte; m, round shaped mitochondria; v, coalescent vesicles; ZP, zona pellucida. Bar = 0.2 μ m.

shape and inner content, ZP deposition and granulosa cells–oocyte junctions. The morphological differences described in this paper could be responsible for some functional differences observed in *Bubalus bubalis* in vitro embryo production (Neglia et al., 2003) and follicular dynamics (Manik et al., 2002), when compared with *Bos taurus* or *Bos indicus* species.

A greater amount of cytoplasmic vesicles was also observed by Boni et al. (1992) in fully developed buffalo oocytes. In the present assessment, these structures were present in the oocytes from the beginning of follicle development which was completely different from that observed in cattle (Fair et al., 1997) and other species. It was also noted that during preantral follicle development, these vesicles tend to coalesce. The large number of these structures, occupying a vast volume of the ooplasm and their greater number when compared with any known functional organelles, may cause the apparently lesser capacity of buffalo oocytes to develop into embryos in in vitro systems. Concerning vesicle exocytosis, it could be inferred that these structures contain ZP material or some oocyte–granulosa cell communication molecules.

In the present study, the mitochondria of the quiescent oocyte were predominantly round with transversal cristae, and different from cattle (Fair et al., 1997) as these maintain this shape until secondary follicle development. Furthermore, the mitochondrial granules observed in other species are not present in buffalo.

Considering the junctions between oocyte and granulosa cells in the present study, no type of specific junction was observed, although, in cattle, adherens junctions were detected between granulosa cells and oocyte because primordial follicles, and gap and zonula adherens-like junctions were also observed between adjacent granulosa cells (Fair and Hyttel, 1997; Kacinskis et al., 2005). Desmosomes were observed joining follicular cells to each other and/or to the

oocyte in cats (Jewgenow and Stolte, 1996), monkeys (Zamboni, 1974) and rabbits (Nicosia et al., 1975). However, in buffalo, as observed in goats (Lucci et al., 2001), special types of junctions (i.e. desmosomes, adherens or tight junctions) were not observed among granulosa cells or between granulosa cells and oocytes. In this latter situation, only the endocytotic contact was clearly visible. Specifically, regarding gap junctions, the reason why they were not observed in the present study may be that none of the follicles evaluated by transmission electron microscopy had the oocyte completely surrounded by ZP. Thus, it can be inferred that while the ZP is not fully developed around the whole oocyte, gap junctions are not necessary to maintain viability, and, therefore, not present at this stage of development. At this stage, substances required for the oocyte metabolic needs could gain access to its cytoplasm by diffusion through the closely opposed membranes of oocyte and granulosa cells in the areas of intercellular contact, or these materials could be incorporated by endocytosis. Whatever the way of contact between oocyte and granulosa cells, this association is extremely important for oocyte growth. The granulosa cells cooperate in oocyte metabolic processes and this cooperation is probably essential for normal oocyte development. Isolated oocytes normally grow *in vitro* only when association with the companion granulosa cells is maintained and the rate of oocyte growth *in vitro* is directly correlated with the number of granulosa cells coupled to the oocyte (McNatty et al., 1999).

When the primary follicle is established the first traces of ZP material were observed in the present study. This result is different from the findings of Rüsse (1983) and Fair et al. (1997) for cattle where the ZP deposition is established only at the secondary stage of development. The initial appearance of the ZP coincides with the appearance of an increased number of microvilli on the oocyte surface and with the formation of granulosa cell process endings in the present study. The ZP was formed in patches over the oocyte perimeter and between granulosa cells. The ZP glycoproteins are synthesized in the rough endoplasmic reticulum (RER) and modified in the Golgi complex, where these are packed into vesicles that migrate to the oolemma for exocytosis (for review, Dunbar et al., 1994). The presence of extensive tubules of RER in the granulosa cells as noted in the present study would appear to create the cellular structures for the production of ZP material in these cells, as previously described in dog ovaries (Blackmore et al., 2004). However, actual exocytosis of ZP material from the oocyte or granulosa cells was not observed.

The well developed smooth endoplasmic reticulum, present mainly in primordial follicles, seems to be responsible for lipid biosynthesis and consequent lipid droplets formation in later oocyte developmental stages. Myelin figures, as described in other species (Miranda et al., 1999; Kacinskis et al., 2005), observed in follicles and granulosa cells are thought to represent digestive vesicles responsible for degradation of aged and non-functional cellular structures (Fawcett, 1966). Oocytes are cells with a very long developmental stage, taking years to leave the quiescent stage and then months to get fully developed. The renewal of organelles, principally in secondary follicles, may be necessary, and the myelin figures observed in the present study might possibly represent digestive vesicles of aged oocyte organelles.

In conclusion, the present study demonstrates, for the first time an ultrastructural description of buffalo preantral follicles. In general, the results indicate that the morphology and the ultrastructure of buffalo preantral follicles resemble that of other mammals. However, some differences were observed, and may indicate species specific differences. An insight into the fine structural organization of buffalo follicles would be of benefit in explaining cellular and molecular aspects of follicle growth and atresia in this species. Moreover, basic knowledge on the ultrastructure of preantral follicles may facilitate the understanding of their *in vitro* development.

Acknowledgement

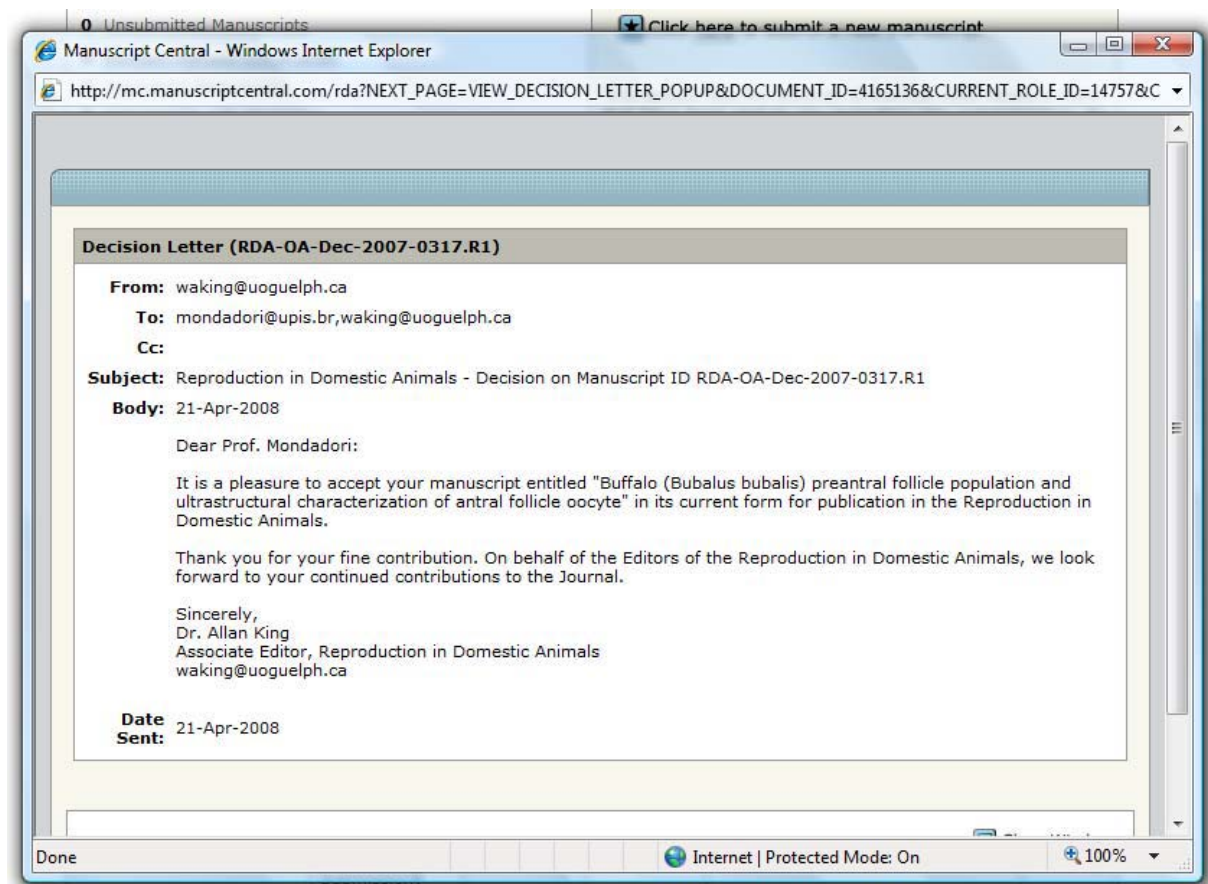
This research was supported by CNPq, CAPES, FINEP and FINATEC.

References

- Baruselli, P.S., Carvalho, N.A.T., 2003. Controle do desenvolvimento folicular para o emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). Rev. Bras. Reprod. An. 27, 94–102.
- Baruselli, P.S., Oliveira, J.F.S., Mendes, M.L.M., Jorge, A.M., Fujii, T., Palazzo, J.P.C., 1993. Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Documento Técnico CATI 94, 16.
- Bayrak, A., Oktay, K., 2003. The expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p15, p16, p21, and p27 during ovarian follicle growth initiation in the mouse. Reprod. Biol. Endocr. 41, <http://www.rbej.com/content/11/1/41>.
- Blackmore, D.G., Baillie, L.R., Holt, J.E., Dierks, L., Aitken, R.J., McLaughlin, E.A., 2004. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. Biol. Reprod. 71, 661–668.
- Boni, R., Santella, L., Dale, B., Roviello, S., Di Palo, R., Barbieri, V., 1992. Maturazione in vitro di oociti buffalini: indagine ultrastrutturale. Acta Med. Vet. 38, 153–161.
- Dunbar, B.S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E., Skinner, S., Wilkins, B., 1994. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. Reprod. Fertil. Dev. 6, 331–347.
- Erickson, B.H., 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J. Anim. Sci. 25, 800–805.
- Fair, T., Hyttel, P., 1997. Oocyte growth in cattle—ultrastructure, transcription and developmental competence. Microsc. Reprod. Dev.: A Dyn. Approach, 109–118.
- Fair, T., Hulshof, S.C.J., Hyttel, P., Greve, T., Boland, M., 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. Anat. Embryol. 195, 327–336.
- FAOSTAT, 2004. Statistical data from Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/>.
- Fawcett, D.W., 1966. An Atlas of Fine Structure—The Cell: Its Organelles and Inclusions, 1st ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- Greenwald, G.S., Moor, R.M., 1989. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. J. Reprod. Fertil. 87, 561–571.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T., 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47, 23–32.
- Jewgenow, K., Stolte, M., 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats—viability and ultrastructural investigations. Anim. Reprod. Sci. 44, 183–193.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., Tilly, J.L., 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature 428, 145–150.
- Kacinskis, M.A., Lucci, C.M., Luque, M.C.A., Bão, S.N., 2005. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. Anim. Reprod. Sci. 47, 45–57.
- Lucci, C.M., Silva, R.V., Carvalho, C.A., Figueiredo, J.R., Bão, S.N., 2001. Light microscopical and ultrastructural characterization of preantral follicles. Small Rumin. Res. 41, 61–69.
- Lundy, T., Smith, P., O'Connell, A., Hudson, N.L., McNatty, K.P., 1999. Population of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. J. Reprod. Fertil. 115, 251–262.
- Madan, M.L., 1988. Status of reproduction in female buffalo. In: Buffalo Production and Health: A Compendium of Latest Research Information Based on Indian Studies. ICAR publications, New Delhi, India.
- Madan, M.L., Raina, V.S., 1984. Fertility and performance of buffaloes under tropical conditions. In: Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, vol. 2, Illinois, pp. 142.1–142.4.
- Manik, R.S., Palta, P., Singla, S.K., Sharma, V., 2002. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. Reprod. Fertil. Dev. 14, 315–325.
- McNatty, K.P., Heath, D.A., Lundy, T., Fidler, A.E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N., Tisdall, D.J., 1999. Control of early ovarian follicular development. J. Reprod. Fertil. Suppl. 54, 3–16.
- Miranda, A.C.L., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y., 1999. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. Tissue Cell 31, 480–488.
- Neglia, G., Gasparrini, B., di Brienza, V.C., Di Palo, R., Campanile, G., Presicce, G.A., Zicarelli, L., 2003. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. Theriogenology 59, 1123–1130.

- Nicosia, S.V., Evangelista, I., Batta, S.K., 1975. Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biol. Reprod.* 13, 423–447.
- Oktay, K., Nugent, D., Newton, H., Salha, O., Chatterjee, P., Gosden, R.G., 1997. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 67, 481–486.
- Rocha Loures, R., 2001. Buffalo production system in Americas. In: *Proceedings of the Sixth World Buffalo Congress*, Maracaibo, Venezuela, pp. 74–86.
- Rüsse, I., 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl. Anat.* 24, 77–92.
- Samad, H.A., Nasser, A.A., 1979. A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. In: *Compendium, 13th FAO/SIDA International Course on Animal Reproduction*, Uppsala, Sweden.
- van den Hurk, R., Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717–1751.
- van Wezel, I.L., Rodgers, R.J., 1996. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol. Reprod.* 55, 1003–1011.
- Zamboni, L., 1974. Fine morphology of the follicle wall and follicle cell–oocyte association. *Biol. Reprod.* 10, 125–149.

ANEXO 2



Buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte

Rafael Gianella Mondadori – Molecular Biology Graduation Program, UnB, Brasília – DF, Brazil and Animal Reproduction Laboratory, Department of Veterinary Medicine, UPIS—Faculdades Integradas, Brasília – DF, Brazil;

Tiago Rollemberg Santin - Animal Reproduction Laboratory, Department of Veterinary Medicine, UPIS—Faculdades Integradas, Brasília – DF, Brazil;

Andrei Antonioni Guedes Fidelis - Animal Reproduction Laboratory, Department of Veterinary Medicine, UPIS—Faculdades Integradas, Brasília – DF, Brazil;

Elaine Paulucio Porfírio - Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasilia, Brasília – DF, Brazil

Sônia Nair Bão - Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasilia, Brasília – DF, Brazil

Abridged title: Buffalo antral follicles' oocyte ultrastructure.

Contents

The main objectives of the present study were to determine the ultrastructural modifications occurring in the oocyte during late folliculogenesis and to estimate preantral follicle population in buffalo. Half the collected ovaries were fixed and prepared for optic microscopy; the antral follicles from the other ovaries were measured and individually punctured. The cumulus-oocyte complexes (COCs) were processed for transmission electron microscopy. The number of preantral follicles in buffalo ovaries was estimated at 19,819 structures. COCs derived from 1 mm antral follicle had an eccentric nucleus and compact *corona radiata*, ooplasm vilosities were fully embedded in *zona pellucida* (ZP) and a well defined junction could be observed. Mitochondria were predominantly round and well distributed in ooplasm, as were small lipid vacuoles. In COCs derived from 2 mm antral follicles, the initial formation of perivitelline space

was observed. The nucleus was peripherally located and the number of pleomorphic mitochondria increased. Cortical granules were clustered at oocyte periphery and lipid vacuoles increased in number and size. In COCs derived from 6 mm antral follicles the organelles were located mainly in the perinuclear region. Golgi complexes and smooth endoplasmic reticulum were more developed. Mitochondria migrated to cortical region and lipid vacuoles migrated to medullar region. In COCs derived from 10 mm antral follicles, the lipid vacuoles coalesced and occupied the medullar region of the oocyte, together with a well developed smooth endoplasmic reticulum. Mitochondria were pleomorphic and located at oocyte periphery. In conclusion, the morphological differences described in this paper could be responsible for some functional differences observed in *in vitro* embryo production and follicular dynamics for buffalo, when compared to cattle.

Introduction

The bubalines occupy specific market niches all over the world, producing milk, meat and work power. In the last 30 years, the bubaline world population (173,921,455) has increased by 53%, while, in the same period, the bovine population has grown by 15% (FAOSTAT, 2006). Since 1973, world buffalo milk production has increased by 200% (Rocha Loures, 2001).

Buffalo productivity is mainly impacted by female reproductive efficiency. These animals, compared with cows, have a later puberty (Drost, 2007a), are short day seasonal breeders (Baruselli et al. 1993) and have a longer gestation period (Madan 1988). It is also known that superovulation is even less predictable in buffalo than in cattle (Drost 2007b). The Ovum Pick-Up (OPU) method allows a recovery rate from 0.7 (Totey et al. 1992) to 2.4 (Kumar et al. 1997) viable structures per ovary, rates much lower than those obtained in bovines. Finally, the

percentage of transferable embryos fully produced *in vitro* is also lower than in bovines (Manjunatha et al. 2007).

There have been many difficulties in obtaining detailed data on buffalo folliculogenesis: along with cited situations, these challenges include the lack of information on ultrastructural modifications occurring in the oocyte during late folliculogenesis and the lack of up-to-date information about preantral follicle population in buffalo ovaries (Danell 1987). Continuing the observations made by our group (Mondadori et al. 2007), the experiments described in this paper were designed to elucidate some important basic information on buffalo folliculogenesis.

Materials and Methods

Ovary collection

Ten ovaries were surgically obtained from five healthy postpubertal buffalo females, not hormonally treated, during the southern hemisphere autumn. The animals' age ranged from 7 to 10 years, each presented estrous cycles at typical intervals before surgical procedure and the body condition score ranged from 2 to 3 (Moreira et al. 2000). Immediately after removal, one of the ovaries of each animal was fixed in 10% formaldehyde. The remaining structures were maintained, for no more than one hour, at 30° C in 0.9% saline solution.

Procedure to estimate the preantral follicle population

In order to estimate the preantral follicle population in buffalo, the fixed ovaries were divided in half and processed for histology, as described by Lucci et al. (1999). Tissue was serially sectioned at 5 µm and stained with PAS and haematoxylin. The number of preantral follicles was estimated by counting the follicles in every 120th section (Cahill et al. 1979) using the nucleus of the oocyte as a marker and the correction factor described by Gougeon and Chainy (1987). Preantral follicles were classified based on their morphology as primordial, primary and secondary. These structures were also classified according to their quality, as morphologically normal or degenerated follicles. Follicular quality was evaluated based on the integrity of the

basement membrane, cellular density, presence or absence of pycnotic bodies and integrity of the oocyte. The diameter of normal follicles and oocytes was determined when the nucleus of the oocyte was observed.

Preparation for cumulus-oocyte complex (COC) collection and transmission electron microscopy (TEM)

The antral follicles from the ovaries maintained in saline solution were measured and individually punctured. The collected COCs, depending on their follicle diameter, were morphologically classified under stereomicroscope, and grade A and B (Zicarelli and Gasparini, 2004) structures were fixed in Karnovsky solution (2% of glutaraldehyde, 2% of paraformaldehyde, 3% of sucrose, in a 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2) at 4° C for 24 h. As described by Hyttel and Madsen (1987), before the post-fixation performed with osmium tetroxide, the COCs were embedded in 4% bactoagar to facilitate manipulation. The material was then contrasted in block with uranyl acetate 3% and the structure was dehydrated with acetone. Dehydrated COCs were included in Spurr and semi-thin sections (2µm) were performed. To allow nucleus detection (equatorial region), the sections were dyed with toluidine blue and observed under light microscopy. The ultrathin sections (90 nm) were made from COCs with intact nucleus and were contrasted with uranyl acetate and lead citrate to be observed with transmission electron microscopy (Jeol 1011) operated at 80 kV.

Results

Number of preantral follicles

The size of the ovaries used in the present experiment fluctuates from 23 X 10 X 10 mm to 25 X 17 X 15 mm. The number of preantral follicles in buffalo ovaries was estimated at 19,819 structures, distributed as follows: 3,519 primordial follicles, 14,672 primary follicles, and 1,628 secondary follicles. As shown in table 1, it was also possible to observe a large individual

variation in the number of preantral follicles in buffalo ovaries, varying from 2,997 to 37,417 structures.

Ultrastructural characterization of antral follicle oocyte

The 1 mm antral follicle oocyte ultrastructure is showed in Figure 1. Although not shown in the image, the oocyte nucleus is eccentrically located. Observing the structural aspects as ooplasm and granulosa cell (GC) nuclei, it is possible to infer that the structure is functionally viable. The GC nucleus presented loose chromatin and the cytoplasm had well developed rough endoplasmic reticulum, showing the high activity on protein synthesis of these cells, which support the oocyte's growth. It is also important to observe the *corona radiata* compaction, with virtually no space between cytoplasmic membranes of neighboring GC. The erect ooplasm vilosities are fully embedded in an apparently soft *zona pellucida* (ZP) and a well defined junction can be observed. Round mitochondria are the predominant form, but some structures apparently subdivided in lobules could be observed. Predominantly small lipid vacuoles and the mitochondria were well distributed in ooplasm. In some structures rough endoplasmic reticulum cisternae, usually combined with round mitochondria, were observed in ooplasm. Few cortical granules were visible in the oocyte cortical region.

The increase in diameter of the follicles (2mm) was accompanied by the initial formation of perivitelline space (Fig. 2) in the examined structures. The development of the perivitelline space was associated with the liberation of the microvilli from the zona pellucida, resulting in a few bent microvilli lying parallel to the ZP. The oocytes, in the process of forming a perivitelline space, displayed both erect and bent microvilli. The nucleus of the oocytes appeared to be peripherally located and had a well developed nucleolus. The oocytes also displayed round mitochondria distributed uniformly in ooplasm, and the number of pleomorphic mitochondria (i.e. those which appeared subdivided in lobules) was apparently higher than in previously described structures. Cortical granules, predominantly located in clusters, increased in number

and size and were generally located in the peripheral area of the oocyte. The number of solitary granules also increased. The lipid vacuoles increased in number and size. It is also important to observe the increasing space between GC, although general aspects of these cells remained unchanged.

Analysis of the subsequent stage was carried out on oocytes obtained from 6mm follicles (Fig. 3). In the oocytes the nucleus was peripherally located and the organelles were located mainly in the perinuclear region. Golgi complexes and smooth endoplasmic reticulum appeared to be more developed than in former analyzed oocytes. Another important characteristic observed was the difference in organelle distribution; mitochondria migrated to the cortical region, whereas lipid vacuoles migrated to the medullar region. The well developed Golgi complex was associated with mitochondria and located in the oocyte cortical region, near the peripheral nucleus. In addition, it is essential to describe an increase in the percentage of pleomorphic mitochondria that were observed.

As the oocytes obtained from 10 mm follicle were analyzed (Fig. 4), the most important change was the consolidation of organelle redistribution. The lipid vacuoles apparently coalesced and occupied the medullar region of the oocyte, together with a well developed smooth endoplasmic reticulum. Almost all mitochondria were pleomorphic and located at the oocyte periphery. The oocyte microvilli were numerous and occupied all the completely developed perivitelline space. The peripherally located and abundant Golgi apparatus was closely associated with mitochondria and smooth endoplasmic reticulum.

Discussion

The results showed that the buffalo ovary had a total number of 19,819 preantral follicles. This number is similar to that described by Danell (1987) and Samad and Nasser (1979) in buffaloes, but much lower than the number described for European (Erickson, 1966) or Zebu (Lucci et al. 2002) cows, for ewes (Rondina et al. 2005) and for goats (Lucci et al. 1999). Comparing the

different values for the species it is possible to infer that the low number of preantral follicles is the main factor responsible for the lower number of antral follicles on the surface of buffalo ovaries (Ty et al. 1989). As also described in the results above, the number of primary follicles is higher than primordial and secondary. Apparently, this feature is inherent to buffaloes, because our group (Mondadori et al. 2007) and another study (Santos et al. 2006) also described the same characteristic, which is different from what is found in other animals such as goats (Lucci et al. 2001), cows (Lucci et al. 2002), ewes (Rondina et al. 2005) and monkeys (Lopes et al. 2006). In addition, the lower overall number of primordial follicles observed in buffalo could also be explained by the time required for follicular development from primordial to primary and primary to secondary stages. Considering that all the animals were at a reproductive age at the moment of ovary removal, it is also possible to infer that the intrinsic difference in follicular population is responsible for the variations observed in the production of female gametes from animal to animal in the same species.

In general, the ultrastructure of buffalo oocytes was similar to that of other mammalian species (cattle: Fair et al. 1997; Hyttel et al. 1997; Kacinskis et al. 2005; pig: Greenwald and Moor 1989; feline: Jewgenow and Stolte 1996; human: Oktay et al. 1997; and goat: Lucci et al. 2001), but some differences were observed, which indicate species-specific characteristics. The morphological differences described in this paper could be responsible for some functional differences observed in *Bubalus bubalis* in vitro embryo production (Neglia et al. 2003; Drost 2007a) and follicular dynamics (Manik et al. 2002), when compared to *Bos taurus* or *Bos indicus* species.

As previously described, the number of lipid vacuoles is higher in buffaloes than in other species from the preantral follicle stage onwards (Mondadori et al. 2007). A greater number of cytoplasmic vesicles was also observed by Boni et al. (1992) in fully developed buffalo oocytes. In the present assessment, we infer that these vesicles are lipid vacuoles mainly because they do

not have a biological membrane; their content could have a lipid chemical composition, which is removed by the use of acetone during dehydration process; and, as the follicle grows (Fig. 1 to Fig. 4), the SER is more developed and the number of vacuoles also increases. The high lipid content in buffalo oocytes was also confirmed by the positive effect of the addition of thiol compound on *in vitro* maturation medium (Gasparrini et al. 2006).

The apparently fragile ZP aspect is similar to that described by Boni et al. (1992) but different from the more compact ZP aspect in bovines (Hyttel et al. 1997), which could provoke a bigger risk of bacterial and viral transmission during genetic material exchange. It is important to note that the same type of junction observed in Fig. 1 was also observed by Boni et al. (1992) in buffalo immature oocytes and by Fair and Hyttel (1997) in cattle. Observing the perivitelline space formation and microvilli liberation from the ZP, it seems that there is no difference between cattle (Fair et al. 1997) and buffalo.

The oocyte organelle distribution changed during follicle growth. A high metabolic activity was observed in all structures, but as the follicle grows, the number of “metabolic units” in the ooplasm, i.e., clusters of mitochondria, smooth endoplasmic reticulum (SER) and lipid vacuoles increases, denoting a rise in oocyte metabolism. As well as the cited organelles, the nucleus also changes its location from eccentric to peripheral as the follicle diameter increases, preparing to resume meiosis. The peripheral localization of the metabolic units observed in oocytes from 10 mm follicles, could be related to the exchange of activity between granulosa cells and oocyte at this level. At this stage, the Golgi complex which produces cortical granules, and the mitochondria which supply energy to the process are localized peripherally, close to the oocyte membrane. Taken together, these characteristics denote a high communication rate between GC and oocyte during all the antral follicle stage.

Considering the GC aspect, i.e., nucleus presenting loose chromatin and the cytoplasm with well developed rough endoplasmic reticulum, it can be concluded that these cells present high activity

in protein synthesis, which supports oocyte growth and development. The increase in follicle diameter induces a loss in GC contact, and this characteristic is compatible with the observations made in our laboratory; normally buffalo COC have fewer layers of cumulus cells than bovine ones and these structures are more sensitive to vacuum pressure, mainly during *in vivo* collection (OPU). Specifically observing this characteristic, it is possible to confirm the hypothesis made by Neglia et al. (2003) that the greater mechanical disruption which oocytes undergo during OPU might result in an improper evaluation of their quality.

In conclusion, this paper and the former results described in Mondadori et al. (2007) pictured the ultrastructural changes occurring during buffalo folliculogenesis, including additional information such as morphometric characterization and follicular population.

Acknowledgments

The author would like to thank Professor Carlos Henrique Camara Saqueti for surgical removal of the ovaries, and Prof. Pietro Sampaio Baruselli and Dr. Nelcio Antônio Toniza de Carvalho for supplying some ovaries for follicle population estimates. This research was supported by CNPq, CAPES, FINEP, FINATEC and UPIS.

References

- Baruselli PS, Oliveira JFS, Mendes MLM, Jorge AM, Fujii T, Palazzo JPC, 1993: Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Documento Técnico CATI 94, 16. Boni R, Santella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R, Barbieri V, 1992: Maturazione in vitro di oociti buffalini: indagine ultrastrutturale. Acta Med. Vet. 38 153–161.
- Cahill LP, Mariana JC, Mauléon P, 1979: Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. J. Reprod. Fertil. 55 27– 36.
- Danell B, 1987 Oestrous behavior, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD thesis, Dept. of Obs. Gyn., Faculty of Vet. Med., Swedish Univ. Agri. Sci. Uppsala, Sweden.

Drost M, 2007a: Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology* 68 447–449. Drost M, 2007b: Advanced reproductive technology in the water buffalo. *Theriogenology* 68 450–453.

Erickson BH, 1966: Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25 800–805.

Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T, Boland M, 1997: Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat. Embryol.* 195 327–336.

Fair T, Hyttel P, 1997: Oocyte growth in cattle—ultrastructure, transcription and developmental competence. *Microsc. Reprod. Dev.: A Dynamic Approach* 1.12 109–118.

FAOSTAT, 2006: Statistical data from Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/>.

Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L, 2006: Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 65 275-87

Gougeon A, Chainy GBN, 1987: Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fertil.* 81 433–442.

Greenwald GS, Moor RM, 1989: Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J. Reprod. Fertil.* 87 561–571.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T, 1997: Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23–32.

Hyttel P, Madsen I, 1987: Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. *Acta Anat.* 129 12-14.

Jewgenow K, Stolte M, 1996: Isolation of preantral follicles from nondomestic cats—viability and ultrastructural investigations. *Anim. Reprod. Sci.* 44 183–193.

Kacinskis MA, Lucci CM, Luque MCA, Bao SN, 2005: Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. Anim. Reprod. Sci. 47 45–57.

Kumar A, Solanki VS, Jindal SK, Tripathi VN, Jain GC, 1997: Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. Anim Reprod Sci 47 189–95.

Lopes LHR , Lucci CM, Garcia MP , de Azevedo RB, Bao SN, 2006: Light Microscopical and Ultrastructural Characterization of Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) Ovarian Follicles. Anatomia, Histologia, Embryologia 35 196–201.

Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Bao SN, Silva JRV, Gonçalves PBD, 1999: Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. Anim Reprod Sci 56 223–236.

Lucci CM, Rumpf R, Figueiredo JR, Bao SN, 2002: Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. Theriogenology 57 1467-1483.

Lucci CM, Silva RV, Carvalho CA, Figueiredo JR, Bao SN, 2001: Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. Small Rumin. Res. 41 61–69.

Madan ML, 1988: Status of reproduction in female buffalo. In: Buffalo Production and Health: A Compendium of Latest Research Information Based on Indian Studies. ICAR publications, New Delhi, India.

Manik RS, Palta P, Singla SK, Sharma, V, 2002: Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. Reprod. Fertil. Dev. 14 315– 325.

Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, Nandi S, 2007: In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. Theriogenology 68 882–888.

Mondadori RG, Luque MCA, Santin TR, Bao SN, 2007: Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 97 323–333.

Moreira FC, Risco MFA, Pires JD, Ambrose M, Drost M, Delorenzo WW, 2000. The Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology* 53 1305-1319.

Neglia G, Gasparrini B, di Brienza VC, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L, 2003: Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59 1123–1130.

Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG, 1997: Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 67, 481–486.

Rocha Loures R, 2001: Buffalo production system in Americas. In: Proceedings of the Sixth World Buffalo Congress, Maracaibo, Venezuela, pp. 74–86.

Rondina D, Freitas VJF, Amorim CA, Mafucci A, Conti S, Cecchi R, Paula NRO, Martini A, 2005: Preantral follicular development in Massese lambs born during two seasons of the year. *Small Ruminant Research* 57 277–280.

Samad HA, Nasser AA, 1979: A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. In: Compendium, 13th FAO r SIDA Int. Course on Anim. Reprod., Uppasala, Sweden .

Santos SSD, Biondi FC, Cordeiro MS, Miranda MS, Dantas JK, Figueiredo JR, Ohashi OM, 2006: Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. *Anim Reprod Sci* 95 1–15.

Totey SM, Singh G, Taneja M, Pawshe CH, Talwar GP, 1992: In vitro maturation, fertilization, and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Reprod Fertil* 95 597–607.

Ty, LV, Chupin, D, Driancourt, MA, 1989: Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.* 19 171–178.

Zicareli L, Gasparrini B, 2004: Advances in buffaloes reproduction. In: *Anais II Simpósio de Búfalos das Américas*, CD-ROM, Corrientes, Argentina.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 – Oocyte from 1 mm antral follicle (TEM) showing lipid vacuoles (V), mitochondria (m), cortical granules (arrow) and cytoplasmic junction (dotted square), and evident granulosa cells (GC) closely related to *zona pellucida* (ZP). Note *inset* showing cytoplasmic junction (open arrows) which is probably an adhering junction, the low number of ooplasm vilosities, and the absence of perivitelline space.

Fig. 2 – Oocyte from 2 mm antral follicle (TEM) showing *zona pellucida* (ZP), ooplasm vilosities (*) in a perivitellinic space; the presence of cortical granules is also noted (arrows), abundant lipid vacuoles (V) and mitochondria (m) in oocyte cytoplasm which present an eccentric nucleus (N) with an evident nucleolus (Nu). In the *inset* the granulosa cells' nuclei (GCn) with loose chromatin and cytoplasm (GCc) are evident. In addition, the cytoplasm is strongly related to an apparently loose ZP.

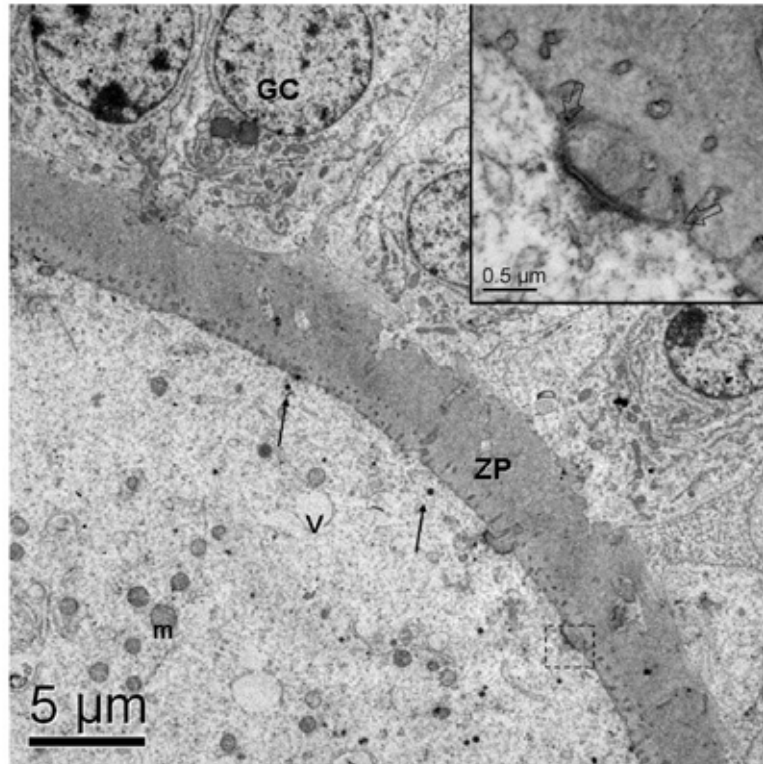
Fig. 3 – Oocyte from 6 mm antral follicle (TEM) showing *zona pellucida* (ZP), ooplasm vilosities (*) in a perivitellinic space, granulosa cells (GC) and a peripherally located nucleus (N) with an evident nucleolus (Nu). The lipid vacuoles (V) assumed a more central position and mitochondria (m) are positioned in the cortical portion of the oocyte. In the *inset* it is possible to observe the interaction between mitochondria (m) and Golgi complex (G), located between the nuclear envelope and oocyte plasma membrane .

Fig. 4 – Equatorial region of an oocyte from 10 mm antral follicle (TEM) showing a well developed perivitellinic space filled with ooplasm vilosities (*), the *zona pellucida* (ZP), and various pleomorphic mitochondria (m) clusters in oocyte cortex. The smooth endoplasmic

reticulum (SER) occupies a vast space on ooplasm, denoting an intense lipid biotransformation.

In some areas (*inset*) there is a close relation between this organelle and the Golgi complex (G).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



- Oocyte from 1 mm antral follicle (TEM) showing lipid vacuoles (V), mitochondria (m), cortical granules (arrow) and cytoplasmic junction (dotted square), and evident granulosa cells (GC) closely related to zona pellucida (ZP). Note inset showing cytoplasmic junction (open arrows) which is probably an adhering junction, the low number of ooplasm vilosities, and the absence of perivitelline space.

188x188mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

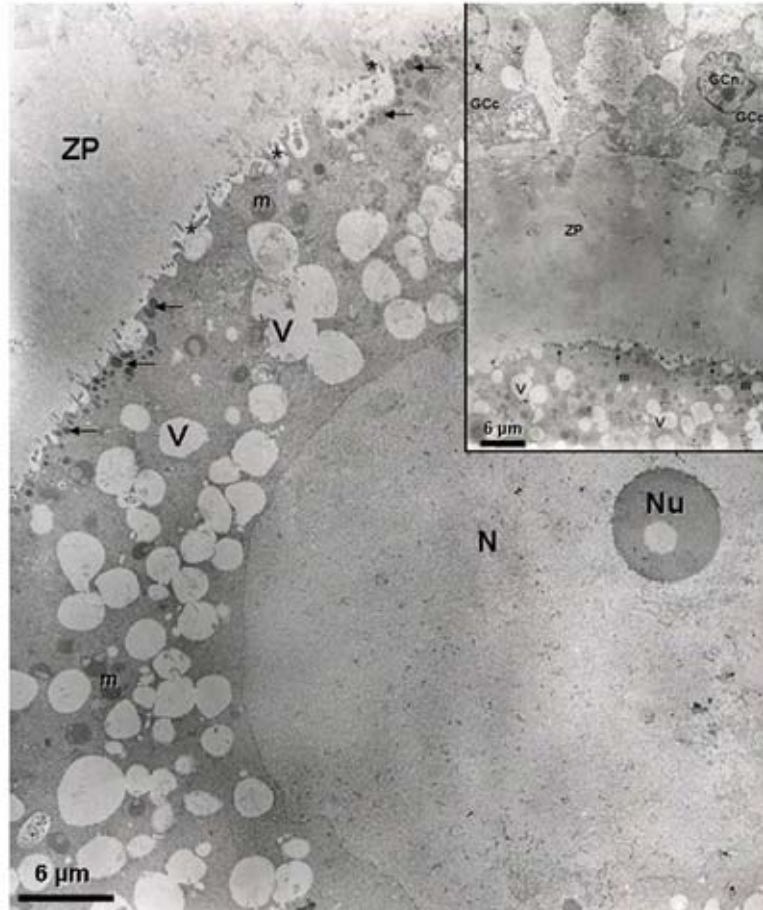
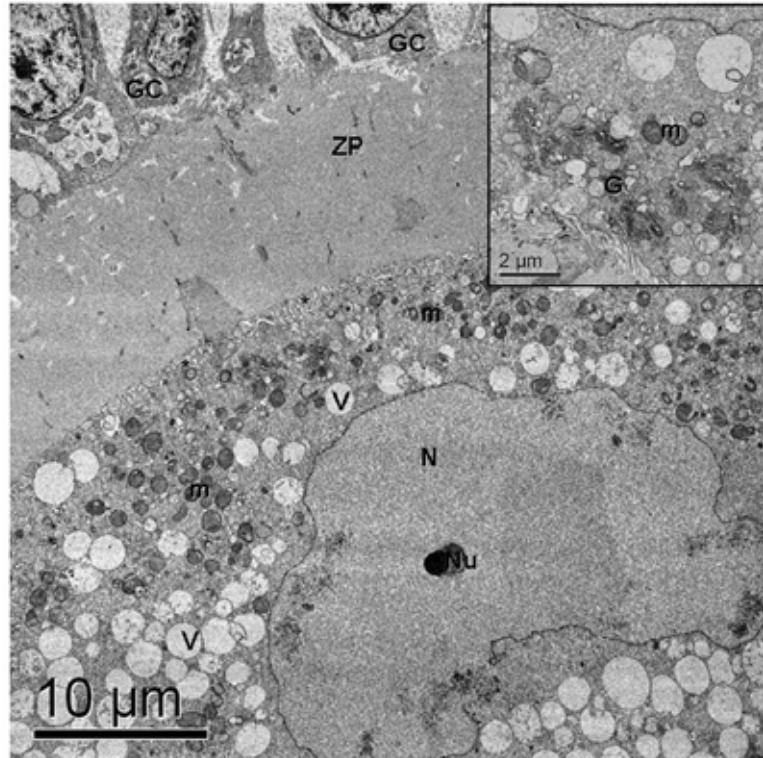


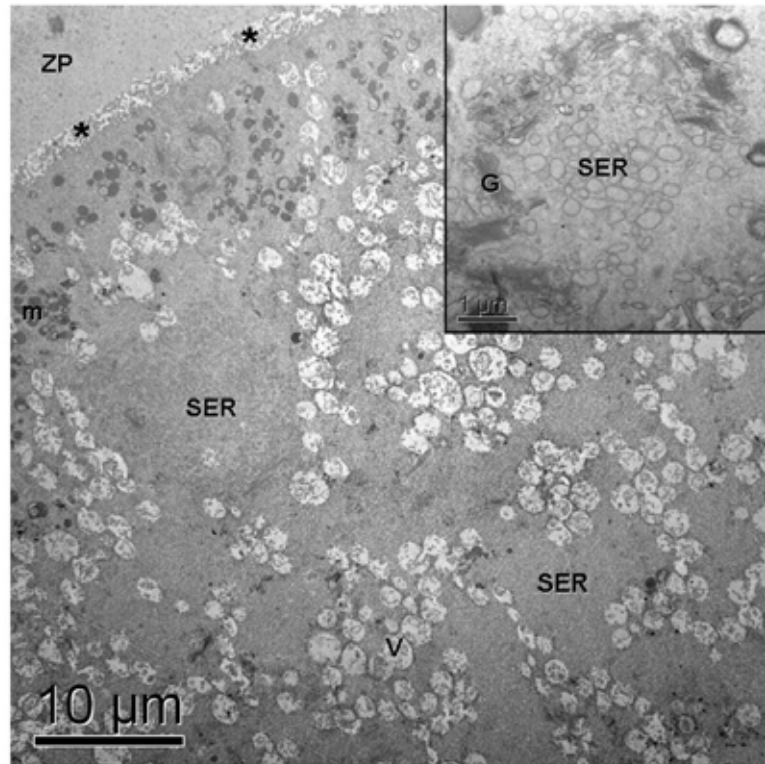
Fig. 2 □ Oocyte from 2 mm antral follicle (TEM) showing zona pellucida (ZP), ooplasm villosities (*) in a perivitelline space; the presence of cortical granules is also noted (arrows), abundant lipid vacuoles (V) and mitochondria (m) in oocyte cytoplasm which present an eccentric nucleus (N) with an evident nucleolus (Nu). In the inset the granulosa cells' nuclei (GCn) with loose chromatin and cytoplasm (GCc) are evident. In addition, the cytoplasm is strongly related to an apparently loose ZP.
159x190mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Oocyte from 6 mm antral follicle (TEM) showing zona pellucida (ZP), ooplasm vilosities (*) in a perivitellinic space, granulosa cells (GC) and a peripherally located nucleus (N) with an evident nucleolus (Nu). The lipid vacuoles (V) assumed a more central position and mitochondria (m) are positioned in the cortical portion of the oocyte. In the inset it is possible to observe the interaction between mitochondria (m) and Golgi complex (G), located between the nuclear envelope and oocyte plasma membrane.
191x189mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Equatorial region of an oocyte from 10 mm antral follicle (TEM) showing a well developed perivitelline space filled with ooplasmic vesicles (*), the zona pellucida (ZP), and various pleomorphic mitochondria (m) clusters in oocyte cortex. The smooth endoplasmic reticulum (SER) occupies a vast space in ooplasm, denoting an intense lipid biotransformation. In some areas (inset) there is a close relation between this organelle and the Golgi complex (G).
191x190mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47Table 1. Preantral follicle population in female Buffaloes (*Bubalus bubalis*)

Follicle classification	Animal					Mean \pm SD
	1	2	3	4	5	
Primordial	6,193.19	3,721.88	1,927.76	729.31	5,022.76	3,518.98 \pm 1,988.37
Primary	28,352.79	30,008.95	10,661.14	1,513.77	2,823.48	14,672.03 \pm 12,263.76
Secondary	2,871.88	3,115.99	1,307.72	754.66	91.19	1,628.29 \pm 1,182.24
TOTAL	37,417.86	36,846.82	13,896.61	2,997.74	7,937.44	19,819.30 \pm 14,552.44

ANEXO 3

Elsevier Editorial System(tm) for Theriogenology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*)

Article Type: Original Research Article

Section/Category:

Keywords: embryo production; transmission electron microscopy; in vitro fertilization; in vitro culture; Murrah buffalo.

Corresponding Author¹: Professor Rafael Gianella Mondadori,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Rafael G Mondadori

Order of Authors: Rafael G Mondadori; Tiago R. Santin; Andrei A. Fidelis; Khesler P. Name; Juliana S. da Silva; Rodolfo Rumpf; Sônia N. Bão

Manuscript Region of Origin:

Abstract: The objectives of the present study were to describe ultrastructural changes in the nucleus and cytoplasmic organelles during in vitro maturation (IVM) of buffalo cumulus-oocyte complexes (COC). The structures were collected by oocyte pick-up (OPU). Some COCs were removed from maturation medium at 0, 6, 12, 18 and 24 h and processed for optic and transmission electron microscopy, and another group was fertilized and cultured. Immature oocytes had a peripherally located nucleus, Golgi complex and mitochondrial clusters, as well as a large number of coalescent lipid vacuoles. After six hours of IVM, the oocyte nucleus morphology changed and granulosa cells (GC) lost most of their contact with zona pellucida (ZP). At 12 h the first polar body was extruded and the aspect of lipid droplet changed. Cortical granules were clearly visible at 18 h of maturation. At 24 h of IVM the number of cortical granules increased. The average total number of COCs collected by OPU session was 4.43/animal, with 44.07% of viable structures. Cleavage rate was 46.15%, and 8.3% of the total number of COCs reached morula stage. In conclusion: (1)

Immature oocytes have a high lipid content; (2) The perivitelline space (PS) increases during IVM; (3) Golgi complexes and mitochondrial clusters migrate to oocyte periphery during IVM; (4) Six hours of IVM are enough to lose contact between GC and ZP; (5) The oocyte lipid droplets' aspect changes between 6 and 12 hours of IVM; and (6) It is possible to produce buffalo embryos *in vitro* during spring-summer period.

Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*)

Running title: Ultrastructure of *in vitro* buffalo oocyte maturation

Rafael Gianella Mondadori – Corresponding author– Molecular Biology Graduation Program, UnB, Brasília – DF, Brazil and Animal Reproduction Laboratory, Department of Veterinary Medicine, UPIS—Faculdades Integradas, Brasilia – DF, Brazil;

Mailing address: Animal Reproduction Laboratory, Department of Veterinary Medicine, UPIS – Faculdades Integradas, SEPS 712/912, Brasilia, DF 70390-125, Brazil

Tel.: 55 (61) 34889902; *Fax:* 55 (61) 34889907.

E-mail address: rmondadori@hotmail.com or mondadori@upis.br.

Tiago Rollemberg Santin – Autonomous Veterinarian, SQN 202, Bloco F, Apto 101, Brasilia – DF, Brazil;

Andrei Antonioni Guedes Fidelis - Centro Internacional de Biotecnologia Reproductiva – CIBRe; Km 12 via Planeta Rica - Monteria Caribe – Colombia;

Khesler Patrícia Olázia Name - Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasilia, Brasilia – DF, Brazil.

Juliana Souza da Silva - Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasilia, Brasilia – DF, Brazil

Rodolfo Rumpf – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – CENARGEN, Brasília – DF, Brazil

Sônia Nair Bão - Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasilia, Brasilia – DF, Brazil

Abstract

The objectives of the present study were to describe ultrastructural changes in the nucleus and cytoplasmic organelles during *in vitro* maturation (IVM) of buffalo cumulus–oocyte complexes (COC). The structures were collected by ovum pick-up (OPU). Some COCs were removed from maturation medium at 0, 6, 12, 18 and 24 h and processed for optic and transmission electron microscopy, and another group was fertilized and cultured. Immature oocytes had a peripherally located nucleus, Golgi complex and mitochondrial clusters, as well as a large number of coalescent lipid vacuoles. After six hours of IVM, the oocyte nucleus morphology changed and granulosa cells (GC) lost most of their contact with zona pellucida (ZP). At 12 h the first polar body was extruded and the aspect of lipid droplet changed. Cortical granules were clearly visible at 18 h of maturation. At 24 h of IVM the number of cortical granules increased. The average total number of COCs collected by OPU session was 4.43/animal, with 44.07% of viable structures. Cleavage rate was 46.15%, and 8.3% of the total number of COCs reached morula stage. In conclusion: (1) Immature oocytes have a high lipid content; (2) The perivitelline space (PS) increases during IVM; (3) Golgi complexes and mitochondrial clusters migrate to oocyte periphery during IVM; (4) Six hours of IVM are enough to lose contact between GC and ZP; (5) The oocyte lipid droplets' aspect changes between 6 and 12 hours of IVM; and (6) It is possible to produce buffalo embryos *in vitro* during spring-summer period.

Key words: embryo production, transmission electron microscopy, *in vitro* fertilization, *in vitro* culture, Murrah buffalo.

Introduction

Superovulatory response and embryo recovery rates in buffalo are lower than in bovines [1]. The number of stimulated follicles and embryos collected in buffalo normally correspond to one third of the obtained in cattle [2]. Despite efforts to use different hormones/protocols [3-5], only 50 to 55% of the animals respond: these buffaloes ovulate 2 to 4 structures, producing 1 or 2 viable embryos [6]. Considering this, *in vitro* embryo production (IVEP) technology represents the best tool to improve maternal contribution to genetic progress in buffalo. Although viable blastocysts have been produced using protocols that have been developed in cattle, the percentage of transferable embryos in buffaloes remains low [7,8].

As previously cited, *in vitro* embryo production (IVEP) for buffalo is based on the bovine model, with some modifications [7,9] made to improve the process, from the oocyte recovery methods to the embryo culture systems. Despite the efforts observed all over the world by different research groups, embryo production has only been between 15 and 30 percent [10]. It is well known that a successful IVEP process can only be achieved if the oocytes are of good quality and the *in vitro* maturation (IVM) runs well. If these two processes are not carefully observed, the *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) will be compromised.

Ultrastructural changes in the oocyte during *in vitro* maturation have been studied in different mammalian species in detail (mouse [11], human, [12] cattle [13], camel [14]). The information obtained from these studies has resulted in a better understanding of the biology of the oocyte, leading to improvements in IVM and IVF of mammalian oocytes. The objectives of the present study were, therefore, (1) to establish the chronological changes in buffalo follicular oocytes matured *in vitro* for different periods of time, and (2) to describe ultrastructural changes in the nucleus and cytoplasmic organelles taking place in the cumulus–oocyte complex (COC) of buffalo during maturation *in vitro*.

Materials and Methods

Animals

The experiments were conducted between July and November, winter and spring in the Southern hemisphere, in Planaltina – Federal District–Brazil (15°38' S and 47°43' W). The animals were fed *ad libitum* with *Panicum sp.*, mineral supplement and received corn silage. The 10 female Murrah submitted to Ovum Pick-Up (OPU) were aged between 2 and 4 years, the average body weight was 360 kg, and the corporal score between 2 and 3 [15]. Before OPU sessions began, the animals were submitted to a complete gynecological examination, with ovarian ultrasonography. The selected animals received a progesterone implant and estradiol benzoate im, to eliminate the dominant follicle.

Ovum pick-up (OPU)

Just before OPU procedure, the animals received 3 mL of lidocaine 2% (Anesthetic Pearson®) via epidural route. The ultrasound equipment used was an Aloka SSD-500, Tóquio, with a micro convex 5.0 MHz probe coupled to a vaginal support equipped with aspiration guide. All viewed follicles were punctured with an 18-Gauge needle connected to a vacuum system (-40mmHg). During aspiration procedure, the aspiration line was constantly washed with LAV medium (100 µl of heparin (Liquemine®), 500 µl of fetal calf serum and q.s.p. 50 mL of PBS). The collected COCs were classified under a stereomicroscope, and only grade I and II [16] structures were used.

Experiment 1 - Ultrastructural changes during in vitro maturation

All media used in the experiment, from IVM to IVC, were granted by Nutricell® Nutrientes Celulares Ltda.

In vitro maturation

A total number of 85 COCs were matured in TCM 199 with Earle's Salts supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), LH, FSH, L-glutamine, penicillin and streptomycin. Each group of 10 to 15 COCs was matured in 150 µl microdrops of medium, covered with mineral oil (AMRESCO[®]), previously stabilized in an incubator chamber at a temperature of 38,5°C, saturated humidity and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

Six to eight structures were removed from maturation drops at 0, 6, 12, 18 and 24h of maturation and processed as described below.

Preparation of COCs for transmission electron microscopy (TEM)

The structures were fixed in Karnovsky solution (2% of glutaraldehyde, 2% of paraformaldehyde, 3% of sucrose, in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2) at 4° C for 24 h. Before the post-fixation performed with osmium tetroxide, the COCs were embedded in 4% bactoagar to facilitate manipulation [17]. The material was then contrasted in block with uranyl acetate 3% and the structure was dehydrated with acetone. Dehydrated COCs were included in Spurr and semi-thin sections (2µm) were performed. To allow detection of the nucleus (equatorial region), the sections were dyed with toluidine blue and observed under light microscopy. The ultrathin sections (90 nm) were made from COCs with intact nucleus and were contrasted with uranyl acetate and lead citrate to be observed with transmission electron microscopy (Jeol 1011) operated at 80 kV.

Experiment 2 – In vitro embryo production

In vitro maturation

A total number of 118 COCs were matured as previously described, for 24 hours.

In vitro fertilization

The fertilization medium was previously prepared by adding 40 µl of PHE (penicillamine, hypotaurine and epinephrine) and 10µl of heparin in 900 µl of specific medium (FEC). The micro-drop volume and number of structures per drop were maintained.

The tested semen used in the experiment was from the same buffalo bull and from the same batch. The matured COCs were co-incubated, for 18h, with 2×10^6 live sperm/ml [18], previously separated by a Percoll gradient.

In vitro culture

The IVC was performed in SOF (synthetic oviduct fluid) supplemented with essential and non-essential amino acids, trisodium citrate, nyo-inositol and 5% of FCS, in the same atmosphere and temperature used for IVM and IVF. Before IVC the excess of *cumulus oophorus* cells was removed by successive pipetting.

Results

Experiment 1 - Ultrastructural changes during in vitro maturation

Fig. 1 shows an immature COC obtained from antral follicle. The oocyte nucleus with loose chromatin is peripherally located. Observing the structural aspects, such as ooplasm and granulosa cell (GC) nuclei, it is possible to infer that the structure is functionally viable. The GC nucleus presented loose chromatin, showing the high activity in protein synthesis of these cells, which will support the oocyte's maturation. It is also important to observe the intimate relation between *corona radiata* cells and *zona pellucida* (ZP), including the presence of cytoplasmic projections in ZP. The perivitelline space (PS) is well developed and the presence is also noted of a large number of bent oocyte microvillousities. Mitochondria are clustered in the oocyte cortical region, as well as the Golgi complex. Most ooplasm is occupied by a large number of coalescent lipid vacuoles.

After six hours of IVM, it is possible to observe a change in the nucleus morphology of the COCs (Fig. 2). Near the nucleus the PS is bigger than in the rest of the oocyte, and not filled with ooplasm vilosities, unlike the rest of the structure. Mitochondria, Golgi complex and lipid

vacuoles did not show significant changes during the first six hours of maturation. The same could not be said of the GC and ZP relationship; six hours were enough to lose the cells from ZP.

Analysis of the subsequent stage was carried out at 12 h of IVM (Fig. 3) and the first polar body (PB) was extruded in a large PS, showing that the oocyte had reached Metaphase II stage. The GC separated completely from ZP. It is important to observe the change in the lipid droplets (ld) aspect, probably denoting a chemical alteration in lipid molecules.

Fig. 4 shows the peripheral region of an oocyte matured for 18 hours. The ld maintains a dark aspect and the PB is located in a PS filled with ooplasm vilosities. The most important change observed at this stage is the presence of cortical granules located in the ooplasm cortical region.

At the end of the IVM period (24 h), it is possible to note (Fig. 5) the large dark ld and numerous cortical granules on the oocyte periphery.

Experiment 2 – In vitro embryo production

All the animals used in the experiment had no corpus luteum in the ovaries characterizing seasonal anestrus.

As shown in Table 1, a decrease was observed in the average number of collected COCs, from 8.3 to 3.9 structures per animal. In addition, the percentage of viable structures also decreased from 47% to 35%. In the same table it is also important to note the remarkable individual variation: one animal produced an average of 11 structures, while another just produced 3 COCs per OPU section. The animal individuality also affected the percentage of viable structures, with some animals with 100% of usable structures and others with just 5.88%.

The IVEP data is illustrated in Table 2. From 52 COCs 46.15% of cleavage was obtained, but only two morulae were used in the experiment, corresponding to 8.3% of the total number of COCs..

Discussion

Experiment 1 - Ultrastructural changes during in vitro maturation

The IVM medium used in the experiment has basically the same composition as that previously used for buffalo oocytes [19], which resulted in viable blastocysts. Immature COCs showed the typical structure previously described for the specie [20,21], as well as a similar structure to bovine [22,23, 24], ovine [25] and camel [26], oocytes. The most important difference observed between the species is the larger number of lipid droplets in buffalo ooplasm. The same sort of GC-oocyte junctions previously described for buffalo [20,21] and bovines [27], was also observed in some immature oocytes. Although some biological functions of GC-oocytes junctions were not clear, it is well known that these junctions play an important role during oogenesis (in buffalo after ZP formation [28]) and IVM in different species [29,30]. The PS in most analyzed immature oocytes was well developed, denoting that the structures were obtained from large antral follicles [21], whereas PS in immature bovine oocytes is absent or narrow [22]. Evaluation of cattle and buffalo immature oocyte allows us to affirm that cortically located mitochondrial clusters and Golgi complex are ultrastructurally characteristic of these structures in both species, and it is also possible to infer that these functional complexes are involved in CG synthesis. This feature could also be used as a marker for oocyte competence because it only appears in oocytes originating from bigger antral follicles [21].

From the start of IVM, as a result of the resumption of meiosis, nucleus morphology changes and PS grows, preparing to receive the polar body. After 6 hours of IVM, the GC-oocytes junctions become loose; considering this, these cells probably do not play an important role in oocyte maturation during the rest of the IVM period. Instead, the separation is probably caused by GC hyaluronic acid production induced by gonadotrophins [31]. In addition, metaphase II phase is complete in most oocytes at 12 h of IVM, differing from previous data published in buffalo [32,33].

The most important change observed between 6 and 12 h of IVM is the change in lipid droplets, probably caused by chemical alteration in lipid molecules. It is well known that buffalo oocytes are more sensitive to oxidative damages because of their high lipid content [20,21]. This observation is confirmed by the increasing proportion of tight morula and blastocyst-stage embryos when cysteamine is used on IVM medium [34], and the confirmation that thiol compounds increase glutathione synthesis in buffalo oocytes [35]. To summarize, our paper demonstrated, with TEM, the lipid modification caused by oxidation. Finally, it is important to observe that at the end of the IVM period, from 18 to 24 h, the cortical granules are located on the ooplasm periphery, denoting preparation for polyspermy block [36].

Experiment 2 – In vitro embryo production

The low number of COCs collected by OPU is probably the result of some peculiarities inherent to buffaloes, such as the reduced number of antral and preantral follicles, approximately ten times lower than in cattle [21,37]. In addition, some hormonal protocols can increase the number of collected structures [38]. The number of COCs per ovary (approximately three structures), was slightly higher than previously described in buffalo [7,10,37], and the percentage of viable structures (44%) was also higher than in one study [39] and lower than in another [10].

The cleavage rate obtained (46%) was similar to that described in the literature [38,40]. In contrast, the embryo production rate was lower than that obtained in buffalo [8]. Taken together, the fact that no thiol compound was used in IVM medium and the change in lipid droplets aspect, is possible to infer that one cause for low embryo production was lipid oxidation. Another negative factor was seasonality: it is possible to produce buffalo embryos *in vitro* during seasonal anoestrous, but the embryo production rates decrease [41].

In conclusion, we can make some statements: (1) Immature oocytes have a high lipid content; (2) The PS increases during IVM; (3) Golgi complexes and mitochondrial clusters migrate to the oocyte periphery during IVM, probably acting on CG synthesis; (4) Six hours of IVM are

enough to lose contact between GC and ZP; (5) The oocyte lipid droplets' aspect changes between 6 and 12 hours of IVM; and (6) It is possible to produce buffalo embryos *in vitro* during spring-summer period.

Acknowledgements

The author would like to thank Dr Rafael Afonso Dresh and Dr. Emivaldo Siqueira Filho for helping on OPU sections, and Nutricell Nutrientes Celulares for supplying media used in the experiment. This research was supported by CNPq, CAPES, FINEP, FINATEC and UPIS.

References

- [1] Baruselli PS, Carvalho NAT. Controle do desenvolvimento folicular para o emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). Rev Bras Repr An 2003;27;94-102.
- [2] Singh J, Nanda AS, Adams GP. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. Anim Repr Sci 2000;60-61;593-604.
- [3] Baruseli PS, Carvalho NAT, Cavalcante, AKS, Nichi M, Zicarelli L. Use of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). Proc. 2nd Congresso Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo, Roma, 2003;1;269-273.
- [4] Carvalho NAT. Uso do agonista de GnRH deslorelina, associado ao LH, para a superovulação de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). Dissertação Mestrado em Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.
- [5] Página: 97
- Misra AK, Kasiraj R, Mutha Rao M, Ragareddy NS, Jaiswal RS, Pant HC. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 1998;50;637-649.

- [6] Manik RS, Singla SK, Palta P, Chauhan MS. Ultrasonographic study of ovulation in buffalo following natural oestrus and after synchronization of oestrus by treatment with prostaglandin or norgestomed and estradiol valerate. *Indian J of An Sci* 2002;72:145-147.
- [7] Gasparrini B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 2002;7:237-256.
- [8] Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Chauhan MS. Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos *in vitro*: Premises and promises. *Reprod Dom Anim* 2002;37:65-74.
- [9] Presicce GA. Reproduction in the Water Buffalo. *Reprod Dom Anim* 2007;42 (Suppl.2):24–32.
- [10] Manjunatha BM, Ravindra JP, Gupta PSP, Devaraj M, Nandi S. Oocyte Recovery by Ovum Pick Up and Embryo Production in River Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reprod Dom Anim* 2008; doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00939.x.
- [11] Merchant H, Chang MC. An electron microscopic study of mouse eggs matured in vivo and in vitro. *Anat Rec* 1971;171:21–38.
- [12] Zamboni L, Thomson RS. Fine morphology of human oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 1972;7:425–57.
- [13] Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47:23–32.
- [14] Kafi M, Mesbah F, Nili H, Khalili A. Chronological and ultrastructural changes in camel (*Camelus dromedarius*) oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 2005;63:2458–2470.
- [15] Moreira FC, Risco MFA, Pires JD, Ambrose M, Drost M, Delorenzo WW. The effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology* 2000;53:1305-1319,.
- [16] Gupta PSP, Ravindranatha BM, Nandi S, Sarma P V. *In vitro* maturation of buffalo oocytes with an epidermal growth factor and fibroblast growth factor. *Ind J Anim Sci* 2002;72:23-26,.

- [17] Hyttel P, Madsen I. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. *Acta Anat.* 1987;129:12-14.
- [18] Gasparri B, De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency on in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci.* 2008;105:354-64.
- [19] Gasparri B, De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*) *An Reprod Sci* 2008;105:354–364.
- [20] Boni R, Santella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R, Barbieri V. Maturazione in vitro di oociti buffalini: indagine ultrastrutturale. *Acta Med Vet* 1992;38:153–161.
- [21] Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Porfirio E Bao SN. Buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte. *Reprod Dom Anim* 2008:in press.
- [22] Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *Reprod Fert* 1986;78:615-625.
- [23] Nagano M, Katagiri S, Takahashi, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote* 2006;14:53-61
- [24] Kacinskis MA, Lucci CM, Luque MCA, Bao SN. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci* 2005;47:45–57.
- [25] O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev.* 2005;8:1029-1037.

- [26] Kafi M, Mesbah F, Nili H, Khalili A. Chronological and ultrastructural changes in camel (*Camelus dromedarius*) oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 2005;63:2458-2470.
- [27] Fair T, Hyttel P. Oocyte growth in Cattle – Ultrastructure, transcription and developmental competence. *Microsc Reprod Dev: A Dynamic Approach* 1997;1.12;109–117.
- [28] Mondadori RG, Luque MCA, Santin TR, B ao SN. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *An Reprod Sci* 2007;97;323–333.
- [29] Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 1995;40;338-344.
- [30] Suzuki H, Jeong BS, Yang X. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 2000;63;723-729.
- [31] Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russel PT, Cannon M, Larsen WJ. Hyaluronic acid synthesis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 1990;26;236-247.
- [32] Santos SSD, Dantas JK, Miranda MS, Ohashi OM. Cin tica da maturac o nuclear in vitro de oócitos bubalinos. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2002;39;266-270.
- [33] Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PSP, Sarma PV. Timing of sequential changes in cumulus cells and first polar body extrusion during in vitro maturation of buffalo oocytes. *Theriogenology* 2002;57;1151-1159.
- [34] Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology* 2000;54: 1537-1 542.
- [35] Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol

compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development.

Theriogenology 2006;65:275–287.

[36] Cran DG, Cheng WTK. Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation.

Gamete Research 1985;11;311-319.

[37] Drost M. Advanced reproductive technology in the water buffalo. Theriogenology

2007;68:450-453.

[38] Sá Filho MF, Carvalho NAT, Gimenes LU, Torres Júnior JF, Garcia JM, Tonhati H,

Gasparrini B; Baruselli PS. Efeito do bST na população folicular, na qualidade oocitária e na

taxa de recuperação *in vivo* de oócitos em fêmeas bubalinas. Congresso Brasileiro de

Reprodução Animal, 2005;16.

[39] Baruselli OS, Gimenes LU, Carvalho NAT, Sá Filho MF, Ferraz ML, Barnabé RC. O estado

atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial. Rev. Bras

Reprod Anim 2007;31:285-292.

[40] Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX, Lu KH.

In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from

ovum pick up, Theriogenology 2008;doi:10.1016/j.theriogenology.2007.11.021.

[41] Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, Nandi S. In vitro

developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle.

Theriogenology 2007;68:882-888.

Table 1 – Production of individual Cumulus oocyte complexes (COCs) in female buffalo submitted to ovum pick up (OPU) within a 14-day interval.

Animal	Total COCs			Viable COCs			% of viable COCs
	1 st OPU	2 nd OPU	Average	1 st OPU	2 nd OPU	Average	
530	2	1	1.5	2	1	1.5	100.00
409	8	4	6	3	1	2	33.33
439	12	1	6.5	6	1	3.5	53.85
426	16	6	11	9	2	5.5	50.00
438	7	*	7	4	*	4	57.14
515	6	9	7.5	2	2	2	26.67
340	8	2	5	6	1	3.5	70.00
535	9	4	6.5	6	3	4.5	69.23
543	11	6	8.5	0	1	0.5	5.88
555	4	2	3	1	1	1	33.33
Total	83	35	6.4	39	13	2.25	44.07

* The animal does not participate in a second OPU section.

Table 2 – In vitro buffalo embryo development at different times of embryo culture.

	Selected	Embryo stage at Day 7 after fertilization			
		Cleavage	2-4 cells	8-16 cells	Morula
Total COCs*	COCs				
118	52	24	6	2	2
Percentage	44.07	46.15	25	8.3	8.3

* Two ovum pick up (OPU) sections

Figure captions

Fig. 1 – Immature oocyte (TEM) showing lipid droplets (LD), peripherally located mitochondrial clusters (m) and nucleus (N); granulosa cells (GC) intimately related to *zona pellucida* (ZP), and well developed perivitelline space (PS). Note *inset* showing a well developed Golgi complex (G).

Fig. 2 – (A) Six-hour matured oocyte (TEM), showing a large number of lipid droplets (LD), peripherally located mitochondrial clusters (m) and nucleus (N); granulosa cells (GC) are coming loose from *zona pellucida* (ZP) and the perivitelline space (PS) is larger near the nucleus, possibly preparing for polar body extrusion. In B it is also possible to note a well developed Golgi complex (G), probably involved in cortical granule production and ooplasm vilosities (*) embedded in ZP.

Fig. 3 – Twelve-hour matured oocyte (TEM), showing an extruded polar body (PB) in a large perivitelline space (PS), peripherally located mitochondrial clusters (m). The granulosa cells (GC) are completely separated from *zona pellucida* (ZP). Note *inset* showing the change in the lipid droplets' (ld) aspect, probably denoting a chemical alteration in lipid molecules.

Fig. 4 – Eighteen-hour matured oocyte (TEM), showing an extruded polar body (PB) in a large perivitelline space (PS) fulfilled with ooplasm vilosities, apparently not embedded in *zona pellucida* (ZP). Note the peripherally located cortical granules (CG) and the large lipid droplet (ld).

Fig. 5 – Twenty-four-hour matured oocyte (TEM), showing large lipid droplets (ld) and cortical granules (arrows). Note *inset* with extruded polar body (PB) in a large perivitelline space (PS) and an apparently loose *zona pellucida* (ZP).

Figure 01
[Click here to download high resolution image](#)

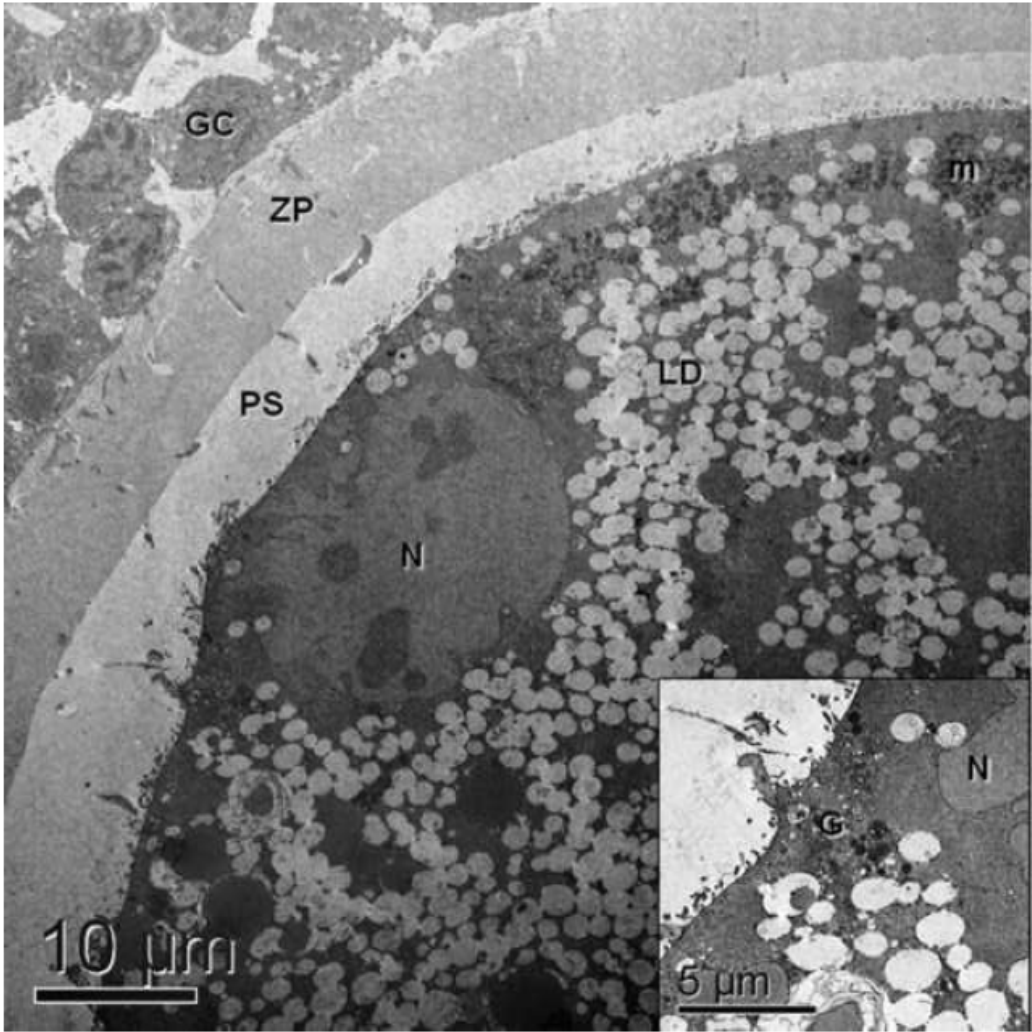


Figure 02
[Click here to download high resolution image](#)

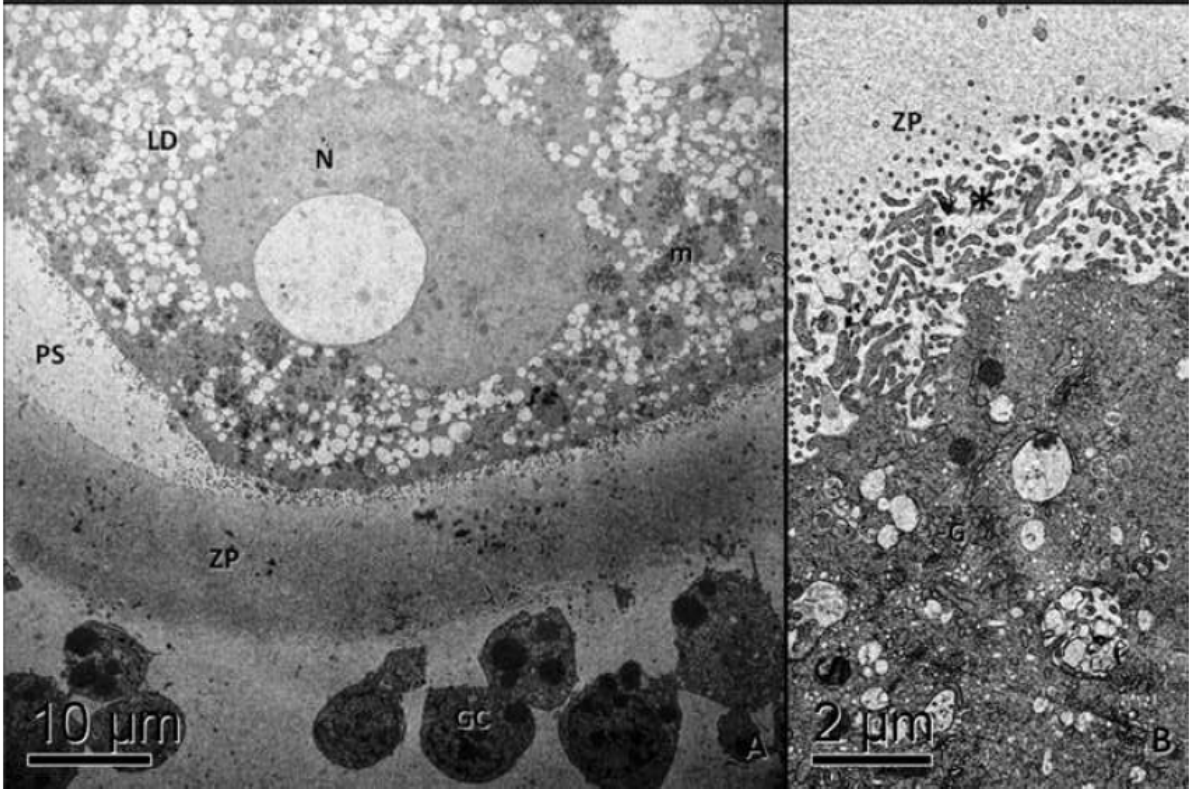


Figure 03
[Click here to download high resolution image](#)

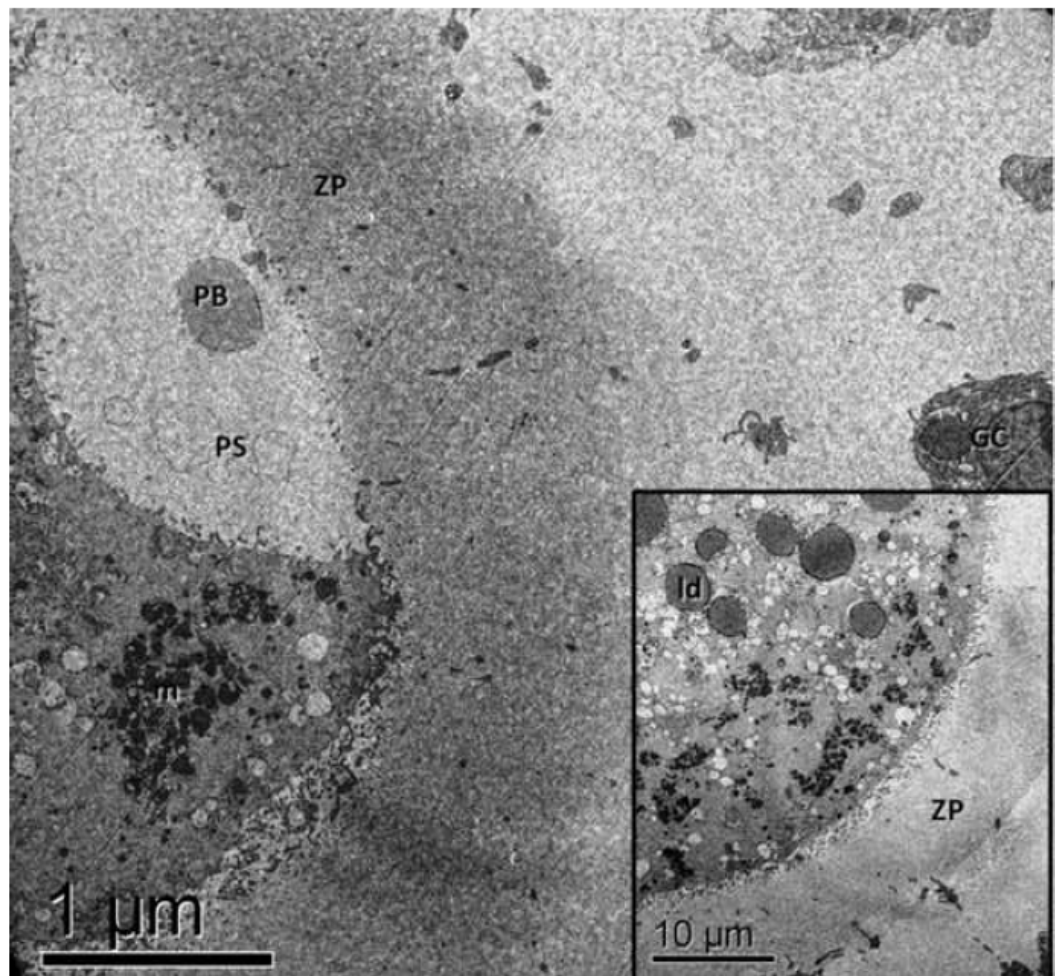


Figure 04
[Click here to download high resolution image](#)

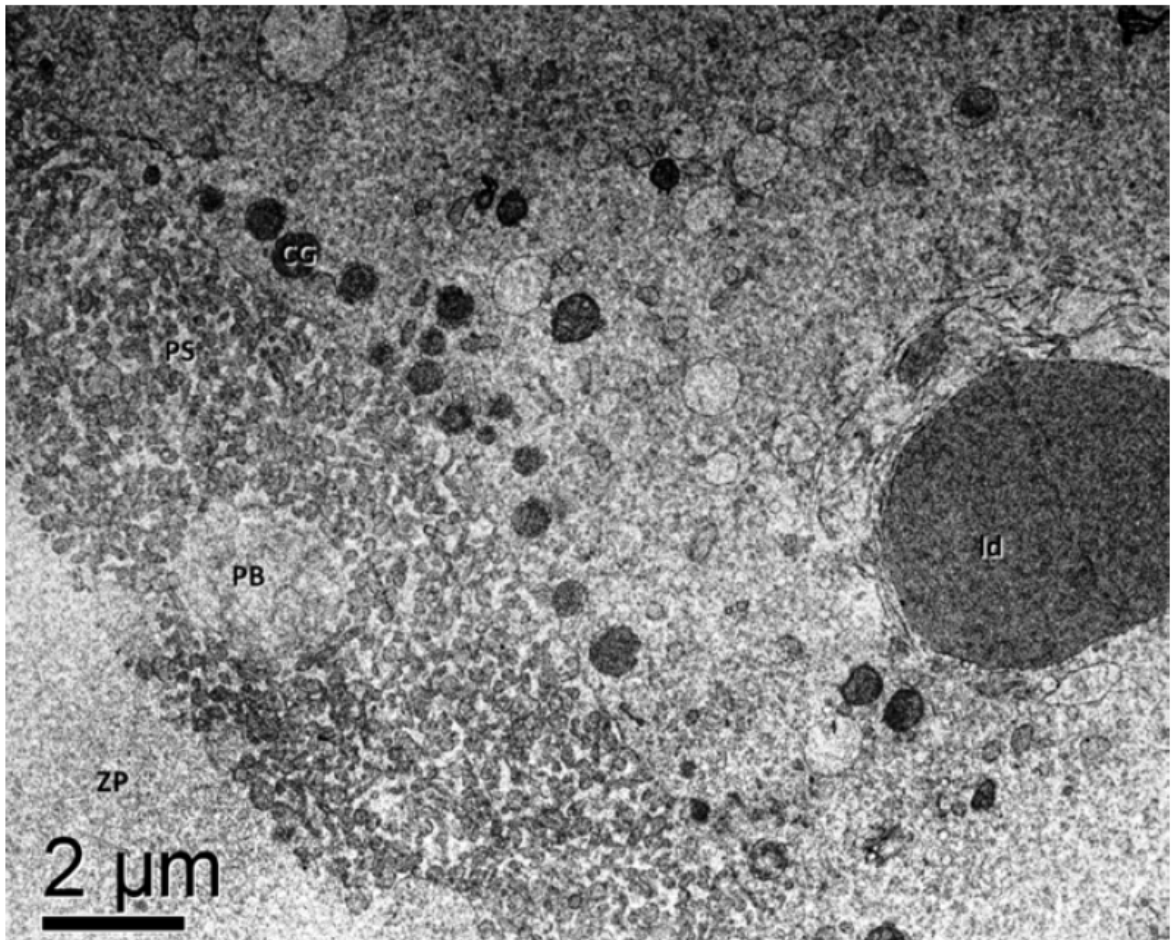


Figure 05
[Click here to download high resolution image](#)

