

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DOS OVÁRIOS EM
EMBRIÕES E FETOS BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Elmo Gomes Diniz
Médico Veterinário

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

Novembro – 2001

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL

**DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DOS OVÁRIOS EM
EMBRIÕES E FETOS BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Elmo Gomes Diniz

Orientador: Cesar Roberto Esper

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia – Área de Concentração em Produção Animal.

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

Novembro – 2001

Diniz, Elmo Gomes

D585d Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore / Elmo Gomes Diniz, Jaboticabal, 2001.

XVI, 77f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2001

Orientador: Cesar Roberto Esper

Banca examinadora: Vênicio José de Andrade, Marcos Silva, Joaquim Mansano Garcia, Vera Fernanda M. Hossipian de Lima.

Bibliografia

1. Bovinos - embriões – fetos. 2. Ovários. 3. Diferenciação sexual. I. Título..
II. Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 591.16:636.2

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
e-mail: egdiniz@ufu.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Elmo Gomes Diniz, nascido em 02 de outubro de 1948, em Pirapora, MG, médico veterinário formado pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em julho de 1974. Obteve o grau de Mestre em zootecnia pela Universidade Federal de Minas Gerais em março de 1983. Trabalhou na iniciativa privada de julho de 1974 a março de 1980. É professor da disciplina de fisiopatologia da reprodução animal, na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia desde abril de 1980, ocupando hoje o cargo de professor adjunto 4. É sócio fundador do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal e membro da Sociedade brasileira de Tecnologia de Embriões, onde ocupa atualmente cargo no conselho fiscal.

Com carinho dedico este trabalho á minha esposa Santuza e aos nossos filhos: Ana Carolina, Pedro Henrique e Alexandre pela compreensão durante todos os momentos. DEUS nos abençoe.

Ofereço aos meus pais, Francisco e Lili, a todos os meus irmãos e aos tios Joaquim Fulgêncio e Celme pelo apoio e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Expresso meus agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cesar Roberto Esper, pela orientação, amizade e confiança durante nosso convívio.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP - Jaboticabal pela oportunidade concedida.

Aos Professores Euclides Braga Malheiros do Departamento de Matemática/UNESP - Jaboticabal e Marcelo Tavares do Instituto de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia, pelas análises estatísticas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, na pessoa do seu responsável Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela colaboração na sexagem dos embriões.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Área de Morfologia, nas pessoas dos Professores Dr. Marcos Silva e Dr. Marcelo Emílio Belleti, pela colaboração, auxílio e sugestões durante a análise das lâminas, e empréstimo do equipamento utilizado.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Ribeiro da área de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia pelas sugestões e auxílio na montagem do texto.

À Professora Neida Junqueira Matos pela correção ortográfica do texto.

Às funcionárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia nas pessoas de Helena Kumiko Endo Faleiros e Fernanda Borges Neto Benevides pelo auxílio.

Aos colegas do curso de pós-graduação em convênio da UNESP - UFG - UFU e demais amigos, pelo agradável convívio e amizade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO DE LITERATURA	4
Origem e Destino das Células Germinativas Primordiais	4
Reação Enzimática da Fosfatase Alcalina	7
Formação das Gônadas e origem das células Somáticas.....	9
Oogênese e Desenvolvimento Folicular ..;;;.....	10
Formação Folicular	14
III MATERIAL E MÉTODOS	17
Sexagem dos Embriões	17
Idade dos Embriões e Fetos	19
Processamento da Técnica Histológica	19
Determinação do Número e Diâmetro das células	20
Análise Estatística	21
IV RESULTADOS	23
Formação e Colonização da Crista Gonádica	23
Oogênese	29
Formação folicular	34
Folículos Primordiais	34
Folículos em Crescimento	37
Folículos Antrais	42

V	DISCUSSÃO.....	47
VI	CONCLUSÕES	53
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios e coeficiente de variação (entre parêntese), do número de células germinativas primordiais, oogônias e folículos nos vários estádios em relação ao período após a fecundação	23
Tabela 2. Diâmetro médio e desvio padrão (entre parêntese), das oogônias e do seu núcleo em fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.....	30
Tabela 3. Resumo da análise de variância dos diâmetros das oogônias (DO) e do núcleo (DN), de embriões e fetos bovinos da raça Nelore.....	33
Tabela 4. Diâmetro dos folículos primordiais, do seu oócito e do núcleo (desvio padrão entre parênteses), de fetos bovinos da raça Nelore nos vários períodos após a fecundação.....	36
Tabela 5. Coeficiente de correlação de Pearson entre as varáveis, diâmetro do folículo primordial (y1), diâmetro do oócito (y2) e do núcleo (y3), em fetos bovinos da raça Nelore.....	37
Tabela 6. Resumo da análise de variância dos diâmetros do folículo primordial (DF), do seu oócito (DO) e do núcleo (DN) de fetos bovinos da raça Nelore	37
Tabela 7. Diâmetro dos folículos em crescimento, do seu oócito e do núcleo (desvio padrão entre parênteses), de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.	38
Tabela 8. Coeficiente de correlação de Pearson, entre as variáveis, diâmetro do folículo (y1), diâmetro do oócito (y2) e do núcleo (y3), dos folículos em crescimento de fetos bovinos da raça Nelore.....	42
Tabela 9. Resumo da análise de variância para os diâmetros do folículo em crescimento (DF), do seu oócito (DO), e do núcleo (DN), em fetos bovinos da raça Nelore	42

Tabela 10. Diâmetro médio dos folículos antrais, do seu oócito e núcleo (desvio Padrão entre parênteses), de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.

46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Embrião de 10mm de comprimento (± 27 dias de gestação), indicando ausência de crista gonádica.....	24
Figura 2. Embriões de 12mm e 15mm (± 29 e 31 dias de gestação respectivamente), indicando crista gonádica formada.....	25
Figura 3. Embrião de 20mm (± 34 dias de gestação), indicando presença de crista gonádica com células germinativas primordiais (CGP)	26
Figura 4. Embrião de 25mm e 30mm (± 37 e 40 dias de gestação respectivamente), mostrando gônada formada e presença de CGP.....	27
Figura 5. Fetos de 45mm, 60mm e 85mm (± 48 , 56 e 66 dias de gestação respectivamente), mostrando oogônias em interfase e em mitose formando ninhos.	29
Figura 6. Fetos de 100mm e 140mm (± 71 e 85 dias de gestação respectivamente), mostrando ninhos de oogônias e oócitos em meiose.....	32
Figura 7. Folículos primordiais com oócitos em vários estádios da prófase meiótica.	34
Figura 8. Folículos primordiais (A, B) e folículos primários (C).....	39
Figura 9 Folículos primários com início de formação da zona pelúcida.....	40
Figura 10. Folículos antrais com antro em formação (A,B) e formados com zona pelúcida evidente (C).	43
Figura 11. Folículos antrais com antro amplo e circundado pela zona pelúcida e células do cumulus oophorus.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1A. Número de CGP de fetos bovinos da raça Nelore aos 34 e 40 dias após a fecundação.....	28
Gráfico 1B. Diâmetro das CGP e de seus respectivos núcleos, de fetos bovinos da raça Nelore.....	28
Gráfico 2A. Número de oogônias de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.	30
Gráfico 2B. Diâmetro médio das oogônias e respectivo núcleo, em fetos bovinos da raça Nelore nos vários períodos após a fecundação.	31
Gráfico 3A. Número de folículos primordiais de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.....	35
Gráfico 3B. Diâmetro médio dos folículos primordiais e de seus respectivos oócitos e núcleos, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.....	35
Gráfico 4A. Número de folículos em crescimento, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.....	41
Gráfico 4B. Diâmetro médio dos folículos em crescimento e de seus respectivos oócitos e núcleos, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.	41
Gráfico 5A. Número de folículos antrais, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.....	45

Gráfico 5B. Diâmetro médio dos folículos antrais e de seus respectivos oócitos e núcleos, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação..... **45**

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Micra
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrômetros
CG	Células germinativas
CGP	Células germinativas primordiais
CV	Coefficiente de variação
DF	Diâmetro do folículo
DN	Diâmetro do núcleo
DNA	Ácido dextrorribonucleico
DNTPS	Desoxirribonucleotídeo
DO	Diâmetro do oócito
DP	Desvio padrão
FA	Fosfatase alcalina
FIG.	Figura
GL.	Graus de liberdade
GLM	<i>General linear models</i>
HE	Hematoxilina- eosina
M.O	Microscopia ótica
NS	Não significativo
PB	Pares de base
PC	Pós coito
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
Pmol	Picromol
QSP	Quantidade suficiente para
TAB	Tabela
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
X	Veze

DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DOS OVÁRIOS EM EMBRIÕES E FETOS BOVINOS DA RAÇA NELORE

RESUMO - Pouco se sabe sobre os eventos morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento pré-natal das gônadas nas raças zebuínas. O objetivo deste estudo foi descrever os eventos morfológicos relacionados ao desenvolvimento pré-natal da gônada, incluindo a sua formação, identificação de células germinativas primordiais, surgimento de oogônios, oócitos e folículos em embriões e fetos da raça Nelore. Oitenta e um embriões e fetos bovinos, com idade variando de 26 a 240 dias após fecundação, foram coletados em frigoríficos. A idade dos fetos foi estimada a partir de medidas tomadas no sentido crânio-caudal e aplicadas à fórmula proposta por Rexroad et. al. (1974). O sexo foi identificado a partir de observações macroscópicas e usando a técnica do PCR (Polymerase Chain Reaction) somente quando as diferenças sexuais morfológicas não foram evidentes. Para histologia, as gônadas foram fixadas em líquido de Bouin por 24 horas. Após processamento histológico, cortes de tecido de 5 μ m, foram corados com hematoxilina-eosina. Os resultados mostraram que a crista gonádica se formou a partir de 29 dias após fecundação. No 34º dia, células germinativas primordiais foram identificadas. As oogônias surgiram em grande quantidade entre 50 e 100 dias e seu número reduziu drasticamente, atingindo números finais aos 140 dias. Os folículos primordiais, folículos em crescimento e antrais apareceram em média aos 95, 140 e 180 dias, respectivamente. Oogônias e folículos primordiais, de forma diferente dos folículos em crescimento, apresentaram diferenças significativas no seu diâmetro nos vários períodos estudados. Folículos antrais mostraram diâmetro médio de $96,92 \pm 31,07\mu\text{m}$ aos 180 dias, chegando a atingir médias de $1331,43 \pm 567,43\mu\text{m}$ aos 240 dias. A análise estatística mostrou uma correlação positiva e altamente significativa ($P < 0,01$), entre o diâmetro das oogônias e seu núcleo, como também entre os folículos primordiais e em crescimento com seus oócitos e respectivos núcleos. Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o uso de técnicas histológicas, é adequada para identificar a crista gonádica e presença de células germinativas

primordiais aos 29 e 34 dias após fecundação, respectivamente. A gônada está totalmente formada aos 40 dias. Folículos primordiais, em crescimento e antrais surgem da região profunda do córtex ovariano aos 95, 140 e 180 dias respectivamente.

Palavras-chave: bovinos, diferenciação sexual, embriões, fetos, ovários

MORPHOLOGICAL DEVELOPMENT OF THE OVARIES IN EMBRYOS AND FETUSES OF NELORE BREED BOVINES

ABSTRACT - Little is known about morphological events occurring during the prenatal development of gonads in the Zebu breeds. The objective of this study was to describe the morphologic events related to the prenatal development of the gonad, including its formation, identification of primordial germinative cells, appearance of oogonia, oocytes and follicles in Nelore breed embryos and fetuses. Eighty-one bovine embryos and fetuses, with age range from 26 to 240 days following fecundation, were gathered in a local slaughter-house. The age of fetuses was estimated from measures taken in the cranium-caudal direction and applied to the formula proposed by Rexroad et. al. (1974). The sex was identified from macroscopic observations and using PCR (Polymerase Chain Reaction) technique only when the morphologic sexual differences were not evident. For histology, gonads were fixed into Bouin fluid for 24 hours. Then, 5 μ m-tissue cuts were stained with hematoxylin-eosin. The results showed that the gonadal ridge was developed from 29 days following fecundation. At the 34th day, primordial germ cells were identified. Oogonia arose in great quantity between 50 and 100 days and its number reduced dramatically, attaining final numbers at 140 days. The primordial follicles, growing follicles and antral follicles appeared on the average at 95, 140 and 180 days, respectively. Oogonia and primordial follicles, in a different way from growing follicles, presented significant differences in its diameter in the several periods studied. Antral follicles showed $96.92 \pm 31.07\mu\text{m}$ in diameter at 180 days, achieving means of $1331.43 \pm 567.43 \mu\text{m}$ at 240 days. The statistical analysis showed a positive and highly significant correlation ($P < 0.01$), between the oogonia diameter and its nucleus, as well as between the primordial and growing follicles with its oocytes and respective nuclei. The results obtained in the present study allow us to conclude that the use of histological techniques is adequate to identify the gonadal ridge and presence of primordial germinative cells at 29 and 34 days after fecundation, respectively. The

gonad is completely developed at 40 days. Primordial, growing and antral follicles arise from the deep region of the ovarian cortex at 95, 140 and 180 days, respectively.

Keywords: bovine, embryos, sexual differentiation, fetuses, ovaries

I. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro está estimado em aproximadamente 160 milhões de cabeças, com uma composição genética que, embora constituído por várias raças, apresenta predominância de animais zebuínos, especialmente os da raça Nelore, que ocupa quase todo o território nacional.

O Nelore tem merecido especial atenção por parte dos pesquisadores brasileiros, que tentam adequar as tecnologias e os conhecimentos desenvolvidos e adquiridos do *Bos taurus taurus* para o zebu (*Bos taurus indicus*), devido à sua grande importância social e econômica para o Brasil.

Estudos têm demonstrado que existem diferenças comportamentais e, provavelmente, morfológicas entre as raças taurinas e zebuínas. Estas diferenças ocorrem também no aspecto reprodutivo, o que torna importante conhecer os eventos que ocorrem no início do desenvolvimento dos órgãos sexuais, especialmente nas gônadas.

Pesquisas sobre os eventos morfológicos que ocorrem no desenvolvimento gonádico em fêmeas zebuínas, são escassas, especialmente durante as fases pré-natal. Em raças européias, segundo SHORT (1982), no indivíduo em formação, há potencialidades para originar órgãos masculinos e femininos, sendo este estágio denominado indiferenciado.

Ainda, segundo o mesmo autor, o caminho a ser seguido no processo de diferenciação é determinado pela constituição cromossômica do feto.

As células germinativas primordiais (CGP) foram definidas por McLAREN (1992) como todas aquelas células das quais os descendentes sobreviventes formam gametas.

Na formação gonádica de mamíferos, é bem conhecido que as CGP são primeiro reconhecidas (distinguidas) morfológicamente no endoderma do saco vitelino em estádios iniciais do desenvolvimento embrionário e posteriormente migram para o interior da gônada (FUJIMOTO *et al.* 1977). Há décadas que embriologistas têm se ocupado em estudar a origem e desenvolvimento das CGP em vertebrados. Os

problemas fundamentais, como de localização, caracterização, desenvolvimento e diferenciação das CGP têm sido estudados freqüentemente em camundongos e revistos repetidamente (McLAREN 1981, 1983, 1992).

Para MINTZ (1959), o camundongo tem sido escolhido como espécie preferencial de investigação por causa da ocorrência combinada de fatores relevantes e úteis, sendo um dos principais o fato de que o camundongo é um dos poucos mamíferos onde as CGP exibem uma coloração histoquímica notável, em virtude de apresentarem um conteúdo citoplasmático excepcionalmente alto de fosfatase alcalina (FA), apresentando-se brilhantes e facilmente visíveis nas reações de tecidos, onde as células somáticas que estão em volta são enzimaticamente negativas.

Os resultados obtidos no modelo camundongo são geralmente extrapolados às espécies com embriogênese diferentes. Assim, estudos do desenvolvimento de CGP em embriões bovinos, por exemplo, têm de considerar o crescimento tremendamente rápido do saco vitelino e do mesentério dorsal que interferem na migração ativa de CGP de um sítio extra-gonadal para a crista gonádica (WROBEL & SÜB, 1998).

No entanto, para HEATH (1978), o estudo das CGP de bovino é complicado pelas dificuldades técnicas já que, como em muitos outros mamíferos estas mostram uma reação histoquímica positiva para a FA; contudo, outras células embrionárias também o são, e assim o uso da FA como marcador específico para CGP é sujeito a inúmeras limitações. De acordo com JOST & PRÉPIN (1966), as gônadas bovinas indiferenciadas tornam-se fortemente positivas para FA aos 32º dias e permanecem assim até o ponto de diferenciação sexual que ocorre nesta espécie aos 40 dias de vida embrionária.

Nas fêmeas em geral, a oogônia, que se divide mitoticamente dando origem às células filhas, é um descendente direto das CGP que migrou para a gônada em algum estágio do desenvolvimento embrionário. Em um certo ponto do desenvolvimento, contudo, a mitose é interrompida e as oogônias entram em prófase meiótica e são subseqüentemente chamadas oócitos. (PETERS, 1970).

Para alguns autores (BEAUMONT & MANDL, 1962; BAKER, 1966; ERICKSON, 1966; BLACK & ERICKSON, 1968; PETERS, 1970 e WILSON, 1978), a oogênese tem duração variável conforme a espécie de mamífero. Assim é que em ratos, o processo

de oogênese tem a duração de dois dias, no suíno de três a dez semanas, enquanto que no macaco e no bovino é de mais ou menos três meses. No entanto, os fatores que determinam a sua duração, ainda não foram totalmente identificados.

Após formados, os oócitos começam a ser envolvidos por células foliculares planas e alongadas formando inicialmente os folículos primordiais. No entanto, para CHALLONER (1974); McNAMARA & BLACK (1975) oócitos envolvidos por uma camada de células foliculares de forma cubóide são considerados folículos primários, enquanto que folículos com mais de uma camada de células são considerados folículos secundários, sendo geralmente nesta última fase conhecidos como folículos pré-antrais (VAN DEN HURK *et al.* 1997). Folículos contornados por várias camadas de células iniciam a formação do antro são chamados terciários e atingem seu maior volume celular pouco antes da ovulação sendo denominados folículo de De Graaf. Nestas últimas fases são conhecidos como folículos antrais.

De acordo com MOUSTAFA & HAFEZ (1971), ovários de fetos bovinos de dois a três meses contêm folículos primordiais em formação com folículos atrésicos sendo observados em vários estádios do desenvolvimento, com a maioria das células germinativas tornando-se folículos primordiais em torno dos 175 dias de gestação.

O conhecimento do desenvolvimento ovariano em embriões e fetos bovinos da subespécie *Bos taurus indicus* será de grande importância na geração de informações a respeito dos processos de superovulação em animais adultos. Essas informações poderão ser utilizadas nas técnicas de transferência de embriões, fecundação “in vitro”, além de transgênia e clonagem.

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o desenvolvimento pré-natal da gônada feminina para se conhecer aspectos morfológicos do sistema genital como: o início do aparecimento de CGP, o surgimento de oogônias, os oócitos e os folículos, além de quantificar e estabelecer o diâmetro destas células nas várias fases do desenvolvimento em embriões e fetos na raça Nelore.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Origem e destino das células germinativas primordiais

Estudos sobre desenvolvimento das gônadas em bovinos foram feitos em animais de raças européias, pouco se sabendo sobre os eventos morfológicos que ocorrem durante este período em animais de raças zebuínas. No entanto, há evidências de que os órgãos internos da reprodução, incluindo as gônadas, se originam junto com as estruturas do mesoderma intermédio. As células germinativas primordiais (CGP) não se formam do material inicial do esboço da gônada, mas se originam à distância e posteriormente migram para esta em todas as espécies de mamíferos (BRAMBEL, 1956).

MINTZ (1959) relatou que em camundongos, grandes células são primeiramente detectadas no saco vitelino. Gradualmente são transferidas, aparecendo no intestino, mesentério dorsal, ângulo celômico e, finalmente, na crista gonádica. Durante o período migratório, seu número aumenta consideravelmente de menos de 100 para mais de 5000. Em estudo com embriões bovinos, ERICKSON (1966) verificou que a crista gonádica se formava aos 32 dias após a fecundação, com o sexo fetal sendo distinguido aos 39 dias por meio da formação da túnica albugínea no testículo primitivo.

Em bovinos, GROPP & OHNO (1966) mostraram a migração das células em embriões de 15mm, com esta completando-se em embriões de 30 a 40mm. Os referidos autores citaram que em mamíferos e outros vertebrados a diferenciação gonádica inicia depois da migração das CGP ter sido completada. Além disso em embriões bovinos aos 15mm uma dobra gonádica já identificava-se e as gônadas de ambos os sexos, em embriões de 30 a 35mm, ainda não mostravam diferenças morfológicas pela histologia convencional. O número de CGP estava aumentado consideravelmente na periferia da gônada da fêmea e diminuído no macho.

De acordo com MATSCHKE & ERICKSON (1969), em bovinos a crista gonádica foi primeiro observada na face ventro-medial do rim mesonéfrico aos 32 dias. A túnica albugínea foi identificada aos 33 dias marcando, assim, a diferenciação microscópica entre ovários e testículos. Já em suínos, aos 24 dias após o coito, as gônadas são

protuberâncias longitudinais localizadas ao longo da superfície medial do mesonefro e consistem de 3 diferentes tecidos: o epitélio superficial, o blastema gonadal e o mesênquima que fica na parte basal da gônada (PELLINIEMI, 1976).

De acordo com PETERS (1970), as CGP surgem extragonadalmente no saco vitelino e migram via endoderma do intestino posterior até o mesentério do intestino, daí para as pregas mesonéfricas e, finalmente, atingem a crista gonádica. Para FUJIMOTO *et al.* (1977), em humanos as CGP são inicialmente identificadas morfológicamente na endoderme do saco vitelino em estádios iniciais do desenvolvimento e eventualmente migram para a gônada em formação, confirmando, assim, estudos anteriores de PELLINIEMI (1976), que identificou CGP em todas as regiões da gônada de suínos de ambos os sexos entre 22 e 24 dias após a concepção. Cabe a este autor a afirmação de que estas CGP apresentavam largas organelas com pseudópodos indicando habilidade migratória, no entanto, várias linhas de evidência têm estabelecido que a linhagem de CGP é derivada do epiblasto (ectoderme embrionário) mais do que da endoderme do saco vitelino (McLAREN, 1983).

De acordo com FUJIMOTO *et al.* (1977) em embriões humanos com 14 somitos, as CGP são encontradas na parede postero-dorsal do saco vitelino (algumas no endoderma do saco). Estas são grandes, possuem um núcleo arredondado e extremamente grande, citoplasma claro e nitidamente demarcadas das células adjacentes. Com 22 somitos (final da 4ª semana) ocorre a migração, passando pelo intestino primitivo para chegarem até à gônada indiferenciada. Com seis semanas as células que não estão na gônada podem estar migrando ou, então, falharam em sua migração

A primeira fase da migração das CGP parece ser passiva, resultante da mudança da forma discóide do embrião para uma formação tubular e incorporação do endoderma do saco vitelino no intestino primitivo posterior. A partir daí, as CGP migram ativamente por movimentos amebóides até a crista gonádica (STWARTZ, 1975; FUJIMOTO *et al.* 1985; MAKABE *et al.* 1989; MOTTA *et al.* 1997).

WARTENBERG (1983) não conseguiu identificar CGP no mesentério dorsal de embriões bovinos de aproximadamente 30 dias de idade, o que o fez acreditar que as

CGP alcançavam a crista gonádica por via sangüínea. No entanto, para DE FELICI (1994), as evidências para o transporte vascular de CGP não são muito convincentes.

Em embriões humanos por volta da 5ª semana cerca de 1000 a 2000 células podem ser vistas migrando em direção à crista gonádica. E embora o fator de iniciação e direcionamento desta migração ainda não esteja totalmente definido, parece depender ou da produção de uma substância quimiotóxica pelo epitélio celômico da gônada em formação (BAKER, 1966; BYSKOV, 1982; GODIN *et al.*, 1990), ou da ação de componentes específicos da matriz extracelular como a fibronectina (FUJIMOTO *et al.*, 1985; MOTTA *et al.*, 1997; McLAREN, 2000).

Para BYSKOV & HOYER (1994), na maioria dos mamíferos as cristas gonádicas surgiram como espessamento na superfície ventrolateral de cada mesonefro, começando já no 10ª dia *post coitum*.

SHIM & ANDERSON (1998) afirmaram que, em suínos, as CGP mostravam-se diferenciadas das células vermelhas e de outras células somáticas pelo seu grande tamanho e que, em cultivo, elas dobravam em número a cada dois dias.

As CGP invadem e colonizam as áreas superficiais da crista gonádica no final da 5ª e durante a 6ª semana de desenvolvimento. Na crista gonádica as CGP tornam-se grandes, hiperplásicas, assumem aspecto amebóide e espalham-se entre o epitélio celômico e o mesênquima (MEDEIROS & YAMAMOTO, 1998). Uma vez no interior da gônada em formação, as CGP dividem-se rapidamente por mitose, alcançando na 10ª semana a população de aproximadamente 600.000 células. Ao redor da 7ª semana há uma grande mistura de células germinativas (CG) e células somáticas dispostas em cordões envolvendo ninhos de CG. A posterior fragmentação destes cordões de células somáticas englobando CG dará origem aos folículos primordiais (GONDOS *et al.*, 1971; MEDEIROS & YAMAMOTO, 1998). Ainda de acordo com MEDEIROS & YAMAMOTO (1998), a partir da 9ª semana após a fecundação, as CGP que alcançaram a crista gonádica e encontravam-se integradas ao ovário, iniciavam sua diferenciação para oogônias. Estas têm maior atividade mitótica e tendem a formar aglomerados de células em divisão, interligados por pontes com as funções de coordenar a diferenciação ou degeneração das CG. Estes grupos celulares continuam sua proliferação mitótica até atingirem cerca de 6 a 7 x 10⁶ oogônias. A partir da 12ª - 13ª semanas após a

fecundação, as oogônias localizadas no córtex ovariano iniciam sua diferenciação em oócitos (GONDOS *et al.*, 1971). À semelhança das oogônias pode-se também identificar ninhos de oócitos interligados por pontes. A meiose tem início nesta fase de desenvolvimento; tanto as oogônias como os oócitos estão circundados por células planas, achatadas, derivadas do componente somático. Estas células também proliferam ativamente, misturam-se com os oócitos, englobando-os numa estrutura semelhante ao folículo, contendo, às vezes, mais de uma CG (MEDEIROS & YAMAMOTO, 1998).

Em embriões de ovelhas aos 24 dias de gestação, já é possível identificar CGP localizadas na crista gonádica (ECKERY *et al.*, 1996). A primeira manifestação do desenvolvimento gonádico nas várias espécies de mamíferos consiste em um relevo na parte medial dos túbulos mesonefros chamado crista gonádica, que se inicia de acordo com FUGIMOTO *et al.* (1977), NODEN & DE LA HUNTA (1990), em embriões de 9-10mm de comprimento, caracterizado por um engrossamento do epitélio celômico e apresentando neste período de 100 a 300 CGP.

Para MACKAY (2000), as CGP retornavam para o embrião passivamente no momento em que o saco vitelino era incorporado pelo intestino posterior, migrando por movimentos amebóides para o mesentério dorsal e ao redor do ângulo celômico até alcançarem seu destino, ou seja, a crista gonádica.

Reação enzimática da fosfatase alcalina

O camundongo tem sido escolhido como espécie preferencial de investigação de desenvolvimento e formação gonádica, graças à ocorrência combinada de fatores relevantes e úteis sendo, um dos principais, o fato desta espécie ser uma das poucas dentre os mamíferos onde as CGP exibem uma coloração histoquímica notável. Isto, em virtude do alto conteúdo citoplasmático de FA, apresentando-se brilhante e facilmente visível nas reações de tecidos, onde as células somáticas ao seu redor são enzimaticamente negativas (MINTZ, 1959).

Em bovinos, GROPP & OHNO (1966) verificaram que o início do desenvolvimento gonádico era caracterizado pela presença de um blastema FA positivo. Seus derivados presentes nas gônadas de ambos os sexos, células foliculares em fêmeas e intersticiais no macho, também apresentavam reação FA positiva. No entanto, as CGP, apesar de serem FA positivas, perdem esta atividade quando se transformam em oogônias e oócitos. Também JOST & PRÉPIN (1966) afirmaram que as gônadas bovinas indiferentes tornavam-se fortemente positivas para a FA aos 32 dias e permaneciam assim, até o ponto de diferenciação sexual, aos 40 dias após fecundação.

Em 1977, FUJIMOTO *et al.*, trabalhando com embriões humanos, verificaram as CGP apresentando reações histoquímicas positivas para a FA, atividade demonstrada seletivamente na membrana plasmática. No entanto, para HEATH (1978), o estudo da CGP de bovinos era complicado pelas dificuldades técnicas, visto que, como em muitos outros mamíferos, estas células apresentavam-se FA positivas. Entretanto, outras células embrionárias bovinas também assim se comportavam. Portanto, o uso da FA como marcador específico para CGP bovinas estava sujeito a várias limitações.

WROBEL & SÜB (1998) caracterizaram as CGP em embriões bovinos como células poligonais, algumas equipadas com finos processos citoplasmáticos, com tamanho variando levemente de acordo com a idade e a localização embrionária. O núcleo mostrava-se, na maioria das vezes, esférico e todas estas células FA positivas. Para estes autores, onde as CGP FA positivas apresentavam-se mascaradas por uma reação FA positiva do tecido adjacente, a histoquímica de lectinas podia ser uma alternativa para sua identificação. No entanto, estes autores testaram 28 tipos de lectinas quanto à sua capacidade de marcar CGP bovinas. Destas, 11 foram selecionadas, apesar da maioria também se ligarem a outros tipos de tecidos embrionários, impedindo, na maioria das vezes, a identificação das CGP.

Para McLAREN (1992), no embrião de camundongo, as CGP mostravam alta atividade para a FA, capacitando-as para serem identificadas histoquimicamente. Assim, usando uma técnica de montagem total, GINSBURG *et al.* (1990) detectaram um cacho de 100 células corando difusamente para atividade de FA em embriões de camundongo em gastrulação (7- 7,25 dias *post-coitum*)..

De acordo com SHIM & ANDERSON (1998) as CGP em migração podiam ser identificadas em camundongos, ratos, coelhos, bovinos e humanos, por suas características morfológicas incluindo seu grande tamanho, núcleo grande e nucléolo proeminente.

Formação da gônada e origem das células somáticas

Óocitos de mamíferos fecundados por espermatozóide portador do cromossoma X se diferenciam em fêmeas (XX). Na presença do cromossomo Y a gônada resultará na formação do testículo. Uma vez que todos os tecidos são diferenciados a partir de células totipotentes, a regulação da diferenciação celular é genética. Os embriões normais (XX) e (XY) de mamíferos, têm gônadas indiferenciadas até aproximadamente a 7ª semana, após a fecundação, podendo diferenciar tanto para ovário como para testículo. Na ausência do cromossomo (Y), a gônada se diferencia em ovário e, de acordo com MEDEIROS & YAMAMOTO (1998), a diferenciação da gônada feminina exige a presença de 2 cromossomos X estrutural e funcionalmente normais em cariótipos XX.

Para BYSKOV & HOYER (1994), na maioria dos mamíferos as cristas gonádicas surgem como espessamento na superfície ventrolateral de cada mesonefro, começando já no 10ª dia *post coitum*.

Também WROBEL & SÜB (1998) em estudos com embriões bovinos, afirmaram que a crista gonádica começava a aparecer entre 27 e 31 dias após a concepção sendo identificada por um epitélio celômico colunar, espessado como uma dupla camada. No 32º dia a crista gonádica se expandia rapidamente e formava a gônada indiferenciada em forma de fuso, que era fixada à região ventromedial dos mesonefros por uma zona de ligação abrangente. Mais tarde no desenvolvimento, esta ligação se diferenciava em pedúnculos caudal e cranial grossos e uma porção média afinada, a mesogônada. Na crista gonádica a membrana basal do epitélio celômico se quebra e os derivados epiteliais penetram na crista, o que, segundo KARL & CAPEL (1998), dará origem às células de Sertoli no macho e às células da granulosa na fêmea.

De acordo com MEDEIROS e YAMAMOTO (1998), as células da granulosa e as células da teca, componentes do folículo com origem no tecido mesonéfrico vizinho, também migram para a crista gonádica. Logo, oócitos e células da granulosa são incorporados no interior dos cordões corticais da gônada em formação. É interessante notar que se as CGP não alcançarem a crista gonádica, o ovário não se desenvolverá (McLAREN, 1991).

Para McLAREN (2000), dentro da gônada em desenvolvimento, numerosas interações ocorriam entre as linhagens de células germinativas e somáticas. Estas são particularmente importantes para o estabelecimento da linhagem espermatogênica no testículo e para a diferenciação do tecido somático no ovário. Outra linhagem importante de células na gônada são as esteroidogênicas ao darem origem no macho as células de Leydig e na fêmea as células da teca. No entanto, sua origem continua sendo obscura (PALMER & BURGOYNE, 1991, SKINNER *et al.* 1985, McCLAREN, 2000).

Assim, o ovário contém células germinativas e somáticas, duas linhas celulares de origens diferentes com funções intimamente relacionadas e interdependentes durante todo o processo de desenvolvimento. Além da presença da estrutura cromossômica normal, a diferenciação ovariana depende da interação normal entre estes diferentes tipos celulares (CGP e somática)

Oogênese e desenvolvimento folicular

A oogônia foi definida por BEAUMONT & MANDL (1962) como sendo uma célula caracterizada por seu grande tamanho e forma esférica ou quase esférica e que, na interfase, o núcleo continha filamentos finos e dois ou mais nucléolos proeminentes.

Em ratos, o processo de oogênese tem a mesma duração entre as espécies de mamíferos já estudados, com as oogônias sendo transformadas em oócitos em dois dias enquanto que, na vaca, o processo entre o início e o fim da oogênese é de mais ou menos três meses (BEAUMONT & MANDL, 1962; ERICKSON, 1966).

As células germinativas na gônada feminina (oogônias), dividem-se mitoticamente dando origem às células filhas. Estas células entram na prófase meiótica e são chamadas a partir daí de oócitos. Em bovinos, a oogônia aparecia no ovário fetal, segundo PETERS (1970) e MOUSTAFA & HAFEZ (1971), aos 55 dias de gestação aumentando em número aos 75 dias e multiplicando-se mais notadamente aos 101 dias.

Existe um consenso de que, na maioria das espécies de mamíferos, o processo de oogênese é completado antes ou logo depois do nascimento, quando as CG entram em prófase da meiose e, tornam-se por definição oócitos, além de cessar a atividade mitótica (FRANCHI, *et al.*1962).

De acordo com MINTZ (1959), experimentos com irradiação mostraram que novos oócitos podiam substituir oócitos degenerados ou perdidos, apenas se alguma oogônia ainda estivesse presente. Com elas, a atividade mitótica podia ser retomada, sem elas o epitélio ovariano falhava em reproduzir novas CG.

De acordo com BEAUMONT & MANDL (1962), a mitose oogonal em ratos estava associada com um aumento da população de CG de 12000 no dia 14,5 para 71.000 no dia 17,5 pós-coito (PC). Entre os dias 17,5 e 18,5 PC, ocasionava uma redução de mais ou menos 3.000 CGP devido ao grande número de divisões atrésicas nestas células.

Do 18,5 dia PC em diante o número de CG decresce uniformemente devido à ocorrência de divisões atrésicas e degeneração caracterizada por leve condensação dos filamentos de cromatina e eosinofilia citoplasmática, além de células atrésicas em diplóteno. Em estudo com embriões e fetos bovinos, ERICKSON (1966) constatou que a meiose se iniciava nos fetos com 75 a 80 dias PC. A mitose cessava entre 150-170 dias e a maioria dos oócitos atingia seu estágio de dictióteno (descanso) em paquíteno da prófase meiótica e eram envolvidos no folículo primordial em torno de 170 dias, com folículos antrais aparecendo nos ovários após 250 dias de gestação. O número de CG aumentou de 16000 no 50º dia PC para 2.7000.000 no 110º dia PC; a partir daí, caiu abruptamente para 107.000 aos 170º dias PC atingindo em média de 68.000 CG aos 270º dias de gestação.

Investigando gônadas de fetos bovinos, OHNO & SMITH (1964), combinando técnicas citológicas e histológicas, revelaram que as regiões mais profundas da gônada feminina apresentaram maior número de CG do que as camadas mais superficiais.

No ovário, as células do cordão folicular se diferenciam com o blastema central associado na zona juncional com a camada periférica da oogônia. Estas são tomadas pelos ramos periféricos das células dos cordões foliculares, sendo então, denominados cordões ovígeros. Durante o movimento descendente junto com estes cordões, as CGP se transformam em oócitos, prosseguindo pela prófase I da meiose e atingem o estágio de dictióteno. Esta maturação das CG parece ser controlada pelas células foliculares e permanecem sob este controle até que um número adequado de células foliculares seja encontrado ao redor de oócitos individuais para formarem os folículos primordiais (GROPP & OHNO, 1966).

Em estudos com embriões e fetos suínos, BLACK & ERICKSON (1968) observaram CG na região da crista gonádica sete dias antes da sua formação, ou seja, aos 24-25 dias. O início da meiose ocorria aos 40 dias, mas apresentava maior número aos cinquenta dias. O diplóteno, que é o estágio de descanso dos oócitos de suínos, surgia primeiro aos 50 dias. O número de CG aumentava dramaticamente dos 20 aos 50 dias PC (5.000 para 1.100.000); subseqüentemente, a atividade mitótica das CG diminuía e havia aumento de necrose das mesmas, resultando uma população de 500.000 CGP ao nascimento. Para estes autores o estoque definitivo de oócitos surgia de um período anterior aos 100 dias PC, sendo o período de 70 dias, o de maior contribuição para o estabelecimento da população da gônada.

De acordo com PETERS (1970), nos mamíferos nem todas as CG presentes no ovário sobreviviam após a divisão mitótica cessar. O número de oócitos não permanecia constante, mas um número considerável se degenerava durante os estádios iniciais da diferenciação do oócito.

A taxa de degeneração de oócitos varia consideravelmente em diferentes espécies. Na espécie humana e nos bovinos apenas 5% do número do pico destas células sobrevivem na gônada durante o nascimento (BAKER, 1963; ERICKSON, 1966).

Em estudo com fetos zebuínos, MBASSA (1989) ao observar o blastema gonadal em embriões de 15 mm de comprimento, constatou que as oogônias estavam na prófase da primeira divisão meiótica em fetos de 35 a 60 mm com folículos primordiais sendo formados em fetos de 60-80mm.

Em ovelhas, JANTOSOVICOVA *et. al.* (1996) verificaram que na 9ª semana de gestação as oogônias e oócitos nos estádios de leptóteno, zigóteno e paquíteno da prófase meiótica estavam arranjados em ninhos. Esporadicamente os oócitos encontravam-se ligados às células pré - foliculares planas e, seu citoplasma, ainda não cobria totalmente o oócito. Neste período a foliculogênese era iniciada e, de acordo com estes autores, nos folículos primordiais desta espécie, os oócitos são apresentados no estágio de diplóteno da prófase meiótica.

Para MEDEIROS & YAMAMOTO (1998), na colonização da gônada, algumas centenas de células deixavam o epitélio da vesícula vitelina, sofriam mitose ativa e aumentavam numericamente durante o trajeto até o primórdio gonadal, ou mesmo após penetração no ovário em desenvolvimento. Os oócitos não circundados pelas células da granulosa, resultantes da divisão meiótica, se degeneravam rapidamente, havendo portanto, necessidade de que os oócitos fossem envoltos pelas células da granulosa para que sua degeneração fosse inibida (BYSKOV, 1986). Nas fases embrionária e fetal as células germinativas podem ser consumidas em dois estádios. Antes mesmo da formação ovariana por degeneração durante a migração da vesícula vitelina até a crista gonadal e, já na crista gonadal, pela atresia destas, antes da formação dos folículos (BEAUMONT & MANDL, 1962).

Na mulher, segundo MEDEIROS & YAMAMOTO (1998), entre a 18ª e 20ª semana da gestação a gônada apresentava o maior número de oócitos nos vários estádios da prófase I da divisão meiótica, oogônias em multiplicação mitótica e grande número de células em degeneração. Estas últimas encontravam-se desde a camada cortical profunda até o epitélio superficial. E, segundo DUVALL *et al.* (1985), macrófagos podiam ser encontrados no interior do parênquima ovariano fagocitando oócitos em avançado estágio de apoptose.

Alcançando o número de células germinativas na metade da gestação, há acentuado consumo destas, resultante do processo de degeneração no interior do

tecido ovariano. A perda ocorre por morte direta, sendo este evento (apoptose) responsável pela eliminação de células isoladas ou em grupo. Em camundongo este mecanismo diferente do fenômeno de atresia folicular, é o mais importante na perda das células germinativas na vida pré-natal (PESCE & De FELICI, 1994).

A perda de oócitos na vida intrauterina pode acontecer também pela simples migração destas células até a superfície ovariana com perda maciça por meio desta superfície por simples esfoliação, que ocorre em todas as fases do desenvolvimento de modo acelerado até o nascimento. Ainda, segundo MOTTA & MAKABE (1986), podia-se inclusive observar pequenos orifícios na superfície ovariana como resultado da ruptura temporária na integridade do epitélio superficial, um tipo de perda que decrescia à medida que se aproximava o final da gestação. Durante o processo de consumo, o número de oogônias em degeneração na interfase ou divisão mitótica não é significativo. No entanto, com o início da meiose, o processo de atresia é acelerado, sendo particularmente sensíveis aqueles oócitos em diplóteno não circundados pelas células somáticas (OHNO & SMITH, 1964).

Formação folicular

Após formados, oócitos começam a ser envolvidos por células foliculares alongadas e planas, formando inicialmente os folículos primordiais. Nos bovinos, os ovários permanecem morfológicamente indiferentes até a formação do folículo primário que, segundo ORTIZ (1945), ocorria aos 170 dias após a fecundação. No entanto, ERICKSON (1966) afirmou que nesta espécie animal a maioria dos oócitos atingia seu estágio de descanso (paquíteno) e estavam envolvidos no folículo primordial aos 170 dias com folículos antrais surgindo no ovário aos 250 dias após a fecundação.

GROPP & OHNO (1966), ao estudarem bovinos *Bos taurus taurus* verificaram inúmeros folículos primordiais sendo formados nas regiões mais profundas da zona cortical em ovários de fetos de 110 a 130mm de comprimento. Já para JOST *et al.* (1972), folículos antrais seriam formados aos 200 dias após a concepção.

De acordo com MOUSTAFA & HAFEZ (1971), ovários de fetos bovinos de dois a três meses continham folículos primordiais em formação com atresia folicular nos vários estádios. No entanto, grande número desses folículos só foram observados a partir de 175 dias após a fecundação.

Em fetos humanos, SCHELHAS (1974) observou que a estrutura ovariana tornava-se evidente entre a 11^a e 16^a semana quando os oócitos circundados pelas células da granulosa se transformavam em folículos primários.

CHALLONER (1974) e McNAMARA & BLACK (1975) definiram os folículos primordiais como aqueles em que o oócito estava circundado por uma única camada de células foliculares achatadas, transformando-se em folículos primários quando estas células assumiam a forma cubóide.

JANTOSOVICOVA *et al.* (1996) em estudo com fetos de ovelhas, verificaram que a foliculogênese era iniciada durante a 9^a semana após a fecundação e que, de forma diferente do bovino, em cujos folículos primordiais os oócitos se apresentavam no estágio de paquíteno da prófase meiótica, estes estavam no estágio de diplóteno, como na maioria das espécies de mamíferos. Também neste estudo os autores encontraram folículos secundários sendo formados e se multiplicando entre a 14^a e 15^a semanas pré-natal, e que folículos antrais foram observados desenvolvendo-se e entrando em atresia entre a 20^a- 22^a semana, com os três estádios de desenvolvimento folicular ocorrendo no dia do nascimento.

Para MEDEIROS & YAMAMOTO (1998), em fetos humanos os folículos primordiais se formavam entre a 8^a e 10^a semana após a fecundação. Estes autores definiram folículos primordiais como aqueles que apresentavam uma única camada de células da granulosa planas oriundas da *rete ovarii*, e se transformam em folículos primários quando as células que envolvem o oócito assumem a forma cubóide.

De acordo com McLAREN (2000), no camundongo, à medida que o nascimento se aproximava, as células somáticas no ovário invadiam os grumos de células germinativas para que cada oócito se tornasse rodeado por uma única camada de células achatadas, as células da granulosa, formando o folículo primordial.

Ainda para MEDEIROS & YAMAMOTO (1998), em fetos humanos havia uma perda maciça de folículos em ovários a partir da 2^a metade da gestação e esta parecia

ser resultante da ausência de envoltório ou camada de células da granulosa nos estádios iniciais da meiose ou da grande sensibilidade do oócito logo após o momento em que alcançava a fase de diplóteno. Podia ainda, ser resultante da migração das células germinativas da área cortical para a camada mais superficial do epitélio celômico que revestia o ovário. No entanto, aventaram a possível participação de vários fatores reguladores intraovarianos, parácrinos e autócrinos na perda e consumo folicular durante a vida intrauterina. Para os referidos autores, independentemente dos mecanismos envolvidos na depleção folicular observada na segunda metade da gestação, o resultado seria uma parada do número de folículos primordiais em torno de 700.000 no momento do nascimento, e que, este consumo contínuo de folículos até o nascimento seria resultante do mecanismo de apoptose, da esfoliação das células germinativas na superfície gonadal e da atresia de oócitos nesta fase.

III. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento gonádico de embriões e fetos femininos de bovinos da raça Nelore, foi nosso objeto de estudo no presente trabalho. Para tanto, foram coletados de fêmeas abatidas em frigoríficos no município de Uberlândia-MG, durante os anos de 1999 e 2000, gônadas de 81 embriões e fetos de vacas Nelore em diversas fases de gestação de acordo com a fórmula proposta por REXROAD et al., (1974) e distribuídos da seguinte forma:

6 embriões de 10 a 12 mm (até 30 dias)

6 embriões de 15 a 30 mm (30 a 40 dias)

5 fetos de 30 a 50 mm (40 a 50 dias)

5 fetos de 50 a 70 mm (50 a 60 dias)

10 fetos de 70 a 160 mm (60 a 90 dias)

12 fetos de 160 a 270 mm (90 a 120 dias)

9 fetos de 270 a 390 mm (120 a 150 dias)

9 fetos de 390 a 530 mm (150 a 180 dias)

8 fetos de 530 a 680 mm (180 a 210 dias)

11 fetos de 680 a 800 mm (210 a 240 dias)

À época da colheita das gônadas fetais procurou-se certificar de que os fetos apresentavam características da raça Nelore, e posteriormente confirmar com o proprietário dos animais se as vacas foram acasaladas com touros da mesma raça.

Sexagem dos embriões

O sexo dos fetos foi determinado por observação macroscópica de suas estruturas enquanto que o dos embriões foi confirmado por meio da técnica do PCR (Polimerase Chain Reaction) conforme descrito por NASCIMENTO, (1997).

A sexagem dos embriões foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. Dos embriões colhidos e que não podiam ser sexados macroscopicamente, após medidos e pesados, foram retirados fragmentos e levados ao laboratório para serem sexados, utilizando-se a seguinte metodologia:

Em primeiro lugar fez-se a extração de DNA de cada amostra. Estes foram quantificados em espectrofotômetro GBC – UV/VIS 911A obtendo-se em média 100 ng de DNA por microlitro (μ l). Para as reações de PCR foram utilizados os seguintes pares de primers, baseados em KIRKPATRICK & MONSON (1993)

Zfx alelo-específico -5' GAC AGC TGA ACA AGT GTT ACT G 3'
 Zfx, alelo-específico -5' AAT GTC ACA CTT GAA TCG CAT C 3'
 Zfy. alelo-específico -5' GAA CGC CTT CGA ATG TGA TAA C 3'
 Zfy, alelo-específico -5' CTG ACA AAA CGT CGC GAT TTC A 3'

Para a reação de PCR, foram adicionados 200 ng de DNA em um mix contendo 1,5 unidade de Taq DNA polimerase, 10 pmoles de cada primer, 100 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (A, T, C, G), 1,5 mM de $MgCl_2$, e tampão da enzima concentrado 1 X, sendo o volume final de 20 μ l completado com água ultra pura.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador PTC 100 MJ Research utilizando-se o programa mostrado na tabela abaixo:

30 CICLOS		
	TEMPERATURA	TEMPO
Desnaturação	95° C	Um minuto
Anelamento	60° C	45 segundos
Extensão	72° C	um minuto

Eletoforese

Após a amplificação, as amostra (10 μ l) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador de luz ultra violeta. Para machos foram visualizadas duas bandas , uma de 167 pares de base (PB) e outra de 247 PB, e para fêmeas apenas uma banda de 247 PB.

Idade dos embriões e fetos

A idade dos embriões e fetos foi estimada baseando-se na fórmula $DG=8,4+0.087C+5,46\sqrt{C}$, onde DG=dias de gestação, C= comprimento do embrião ou feto, proposta por REXROAD *et al.* (1974). Os mesmos eram medidos imediatamente após retirados do útero.

Processamento da técnica histologica

Tomadas as medidas, as gônadas dos fetos ou os embriões foram fixados em líquido de Bouin por 24 horas para estudos em microscopia óptica (M.O.)

As gônadas então fixadas, foram medidas no comprimento, altura e largura para estabelecer o seu volume e logo após, retirava-se um fragmento das mesmas para processamento em técnica histológica clássica, que consistia em:

- a) **Desidratação:** deixar os fragmentos por 1 hora em cada frasco contendo álcool em concentrações crescentes: 85%, 95%, absoluto I, absoluto II, absoluto III.
- b) **Diafanização:** retiraram-se os fragmentos do último frasco com álcool absoluto III e sendo em seguida transferidos para frascos (3) contendo o solvente xilol por 30 minutos, para permitir a penetração da parafina fundida dentro da peça.

- c) **Inclusão:** fragmentos do último frasco contendo xilol foram transportados para recipiente contendo parafina fundida (colocada numa estufa a 56°C). Os fragmentos foram então mergulhados no molde de parafina.
- d) **Corte:** Os cortes foram feitos na espessura de cinco micrômetros com auxílio de micrótomo, distendidos em banho-maria, retirados com lâminas para M.O. e colocados em estufa para secagem e fusão da parafina.
- e) **Coloração:** Os cortes, de pelo menos cinco seções diferentes, foram corados com hematoxilina-eosina conforme indicados por MICHALANY (1980).
- f) **Montagem:** Foi feita colocando-se uma gota de Bálsamo do Canadá sobre o corte, e posteriormente, uma lamínula comprimindo-a de modo a espalhar o Bálsamo de Canadá em fina camada entre lâmina e lamínula.

Os estudos e avaliações das lâminas foram executados no Laboratório de Histologia do Núcleo de Morfologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com o objetivo de determinar o início de colonização gonádica pelas células germinativas primordiais (CGP) e o número e diâmetro destas células, das oogônias, dos oócitos e dos folículos nos seus vários estádios de desenvolvimento.

Os cortes histológicos corados foram analisados em M.O, e fotografados, para documentação, pelo hardware HL image em microcomputador pentium III e as imagens digitalizadas em objetivas de 10 e 40 vezes.

Determinação do número e diâmetro das células

A quantificação e determinação do diâmetro das células germinativas foram feitas por meio do software “HLIMAGE” em microcomputador PENTIUM III, 450 MHZ e monitor SANSUNG SINCMASER 450b. Como a contagem das células foi feita por área do ovário, estes valores foram multiplicados pela espessura do corte (5 μ m) para se obterem valores em μ m³, sendo então transformados em mm³ e, por fim, multiplicados pelo volume da gônada. Como a espessura do corte foi menor que o diâmetro das estruturas medidas, e para evitar duplicidade na contagem dessas em

cada seção, o diâmetro das mesmas foi dividido pela espessura do corte, cujo valor encontrado serviu como divisor do número total de estruturas do ovário, tendo como resultado o *número* final de estruturas da gônada. O volume do ovário foi calculado baseado na fórmula do elipsóide por ser a figura que mais se aproxima de sua forma: Volume = $4/3\pi abc$, onde a= comprimento/2, b= largura/2 e c= altura/2. Além disso, a partir de ± 85 dias após a fecundação, deduziu-se a área correspondente à região da medular pelo fato de ela estar definida e apresentar estruturas germinativas (Oogônias e Folículos) em quantidades mínimas, não participando portanto, como área de cálculo.

Análise estatística

Para os vários tipos de estruturas estudadas (oogônias, folículos primordiais e folículos em crescimento) foram estimados os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis diâmetro da oogônia, do seu núcleo, dos folículos, dos oócitos e do núcleo destes, medidos durante o estudo. As comparações entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo modelo GLM do pacote estatístico SAS (1998). Para analisar o diâmetro destas estruturas utilizou-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + d_i + e_{ij} \quad \text{onde:}$$

Y_{ij} = j-ésima observação feita no i-ésimo dia após a fecundação,

μ = média geral

d_i = efeito do i-ésimo dia

e_{ij} = resíduo.

As células germinativas primordiais e os folículos antrais não participaram destas análises por apresentarem uma amostragem insuficiente.

Para comparar a variabilidade entre o número de células das várias estruturas estudadas utilizou-se o coeficiente de variação (CV %) porque as mesmas foram colhidas de fetos diferentes e não continham o mesmo número de observações.

IV. RESULTADOS

Os resultados deste estudo encontram-se nas Tabelas 1 a 10, nos Gráficos 1A a 5A e 1B a 5B, e mostrados nas figuras de 1 a 11.

Tabela 1. Valores médios e coeficiente de variação (entre parênteses) do número de células germinativas primordiais, oogônias e folículos nos vários estágios em relação ao período após a fecundação, em fetos bovinos da raça Nelore.

ESTRUTURA	DIAS APÓS A FECUNDAÇÃO										
	34	40	50	60	75	100	115	140	180	210	240
CGP*	1331 (10,79)	6455 (16,35)									
Oogônias			130471 (29,31)	232319 (36,33)	1259040 (27,21)	2403346 (18,34)	771263 (70,17)	51609 (9,97)			
Folículos Primordiais						93806 (12,02)	ND**	158465 (5,87)	223643 (22,37)	205505 (16,74)	85460 (4,37)
Folículos em Crescimento.								63339 (22,27)	163216 (16,44)	247696 (24,82)	81135 (10,63)
Folículos antrais									25328 (6,30)	7876 (18,22)	3061 (43,33)

* Células germinativas primordiais

** Não determinado.

Formação e colonização da Crista Gonádica .

A crista gonádica foi inicialmente observada em embriões de 12 a 15 mm de comprimento (29 a 31 dias), conforme se verifica nas figuras 1 e 2,

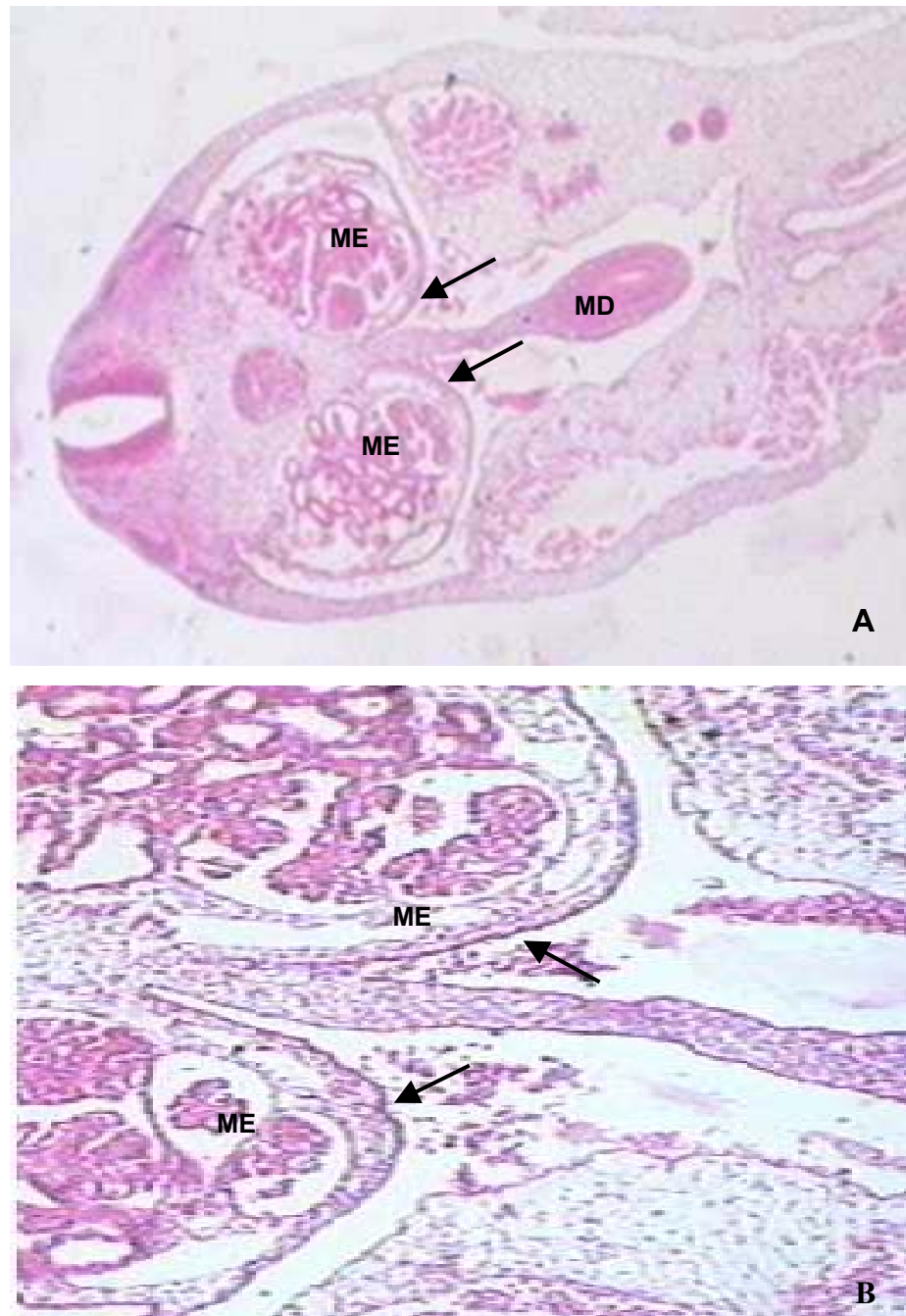


Figura 1. A: Embrião bovino da raça Nelore de 10mm de comprimento (\pm 27 dias de gestação) indicando ausência de crista gonádica (setas). ME (mesonefro), MD (mesentério dorsal) . Preparação em HE. A: 12,5x; B: 40x. Indicando (setas) ligeiro espessamento onde será formada a crista gonádica. ME (mesonefro).

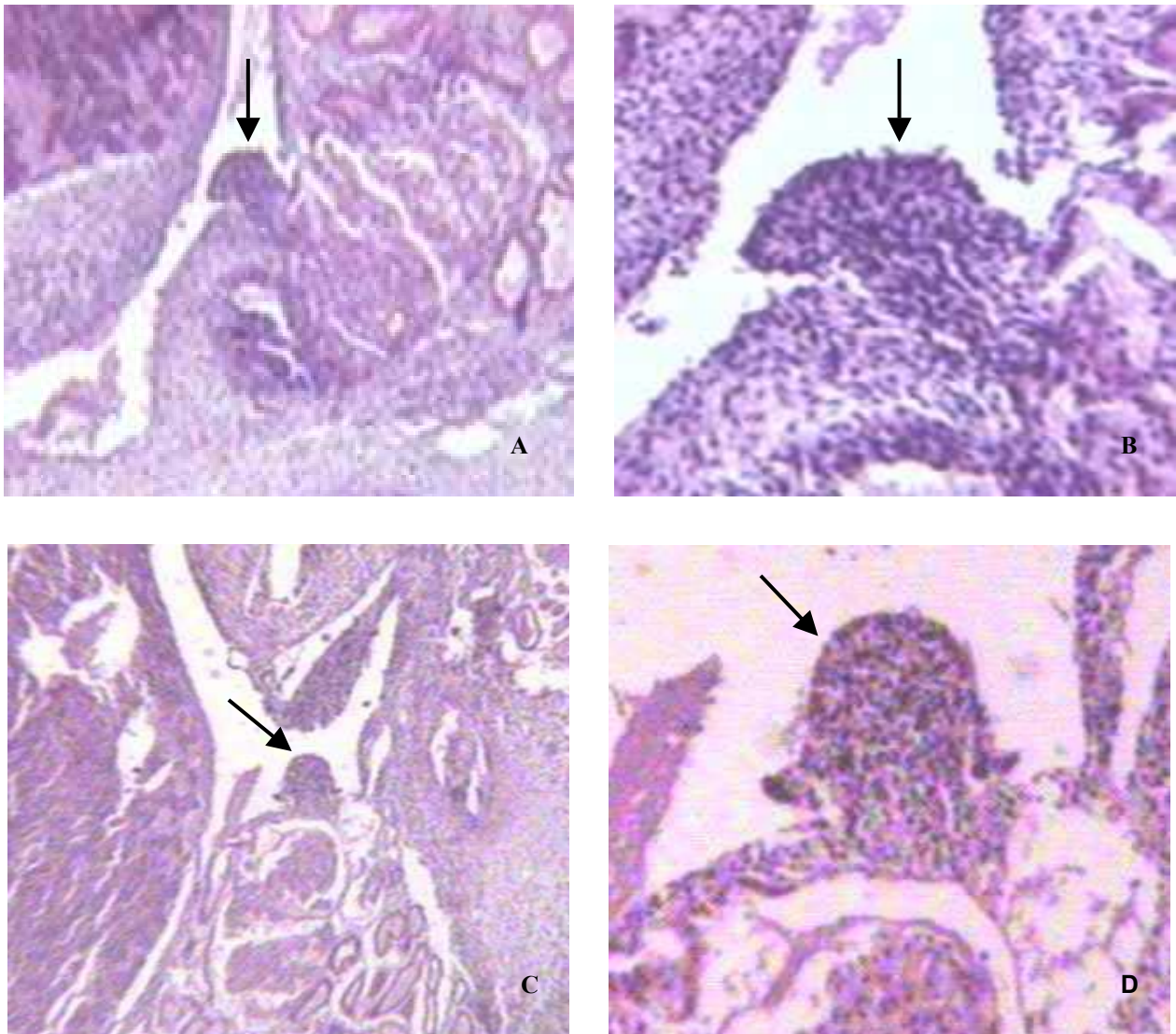


Figura 2. Embriões bovinos da raça Nelore (A, B) de 12mm (\pm 29 dias de gestação) e (C, D) de 15mm (\pm 31 dias de gestação). Setas indicando cristas gonádicas formadas. Não foram identificadas células germinativas primordiais (CGP). A, C: 12,5x; B, D: 40x. HE.

período em que não foram identificadas CGP. Em embriões de 20mm (± 34 dias), a crista gonádica já está mais expandida e são identificadas CGP no interior da mesma (fig.3).

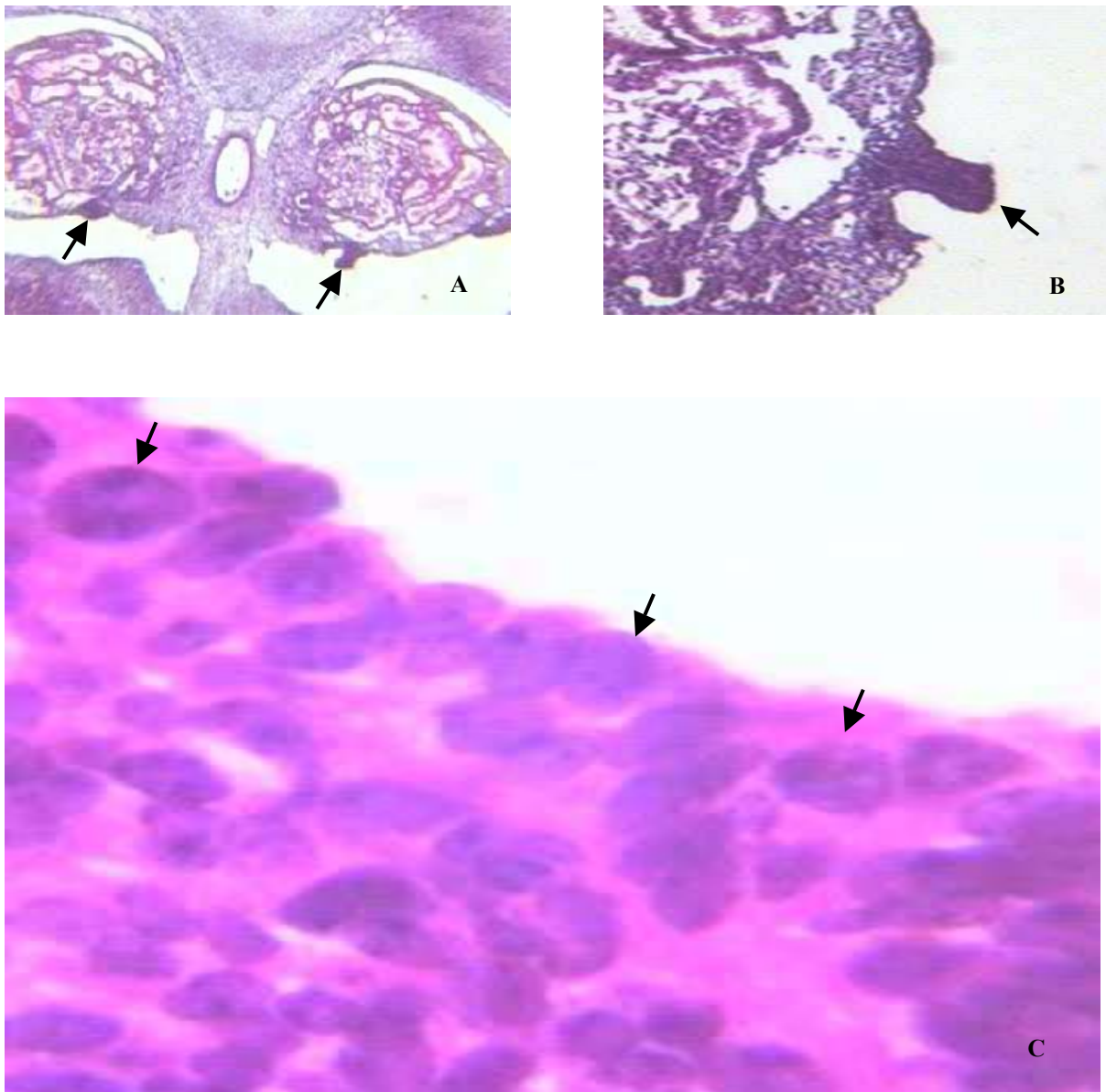


Figura 3: Embrião bovino da raça Nelore de 20mm (± 34 dias de gestação). A: Crista gonádica (setas) 12,5x. B: Crista gonádica 40x. C: Crista gonádica com CGP (setas) 400x. HE.

Neste período foram contadas 1331 células. Número que aumenta para 6455 (figura 4, tabela 1 e gráfico 1A) em embriões de 25 a 30 mm (± 40 dias) onde a gônada já se encontra totalmente formada. O diâmetro médio das CGP nesta fase é de $8,15\mu\text{m}$ com o núcleo medindo $5,58\mu\text{m}$ (gráfico 1B).

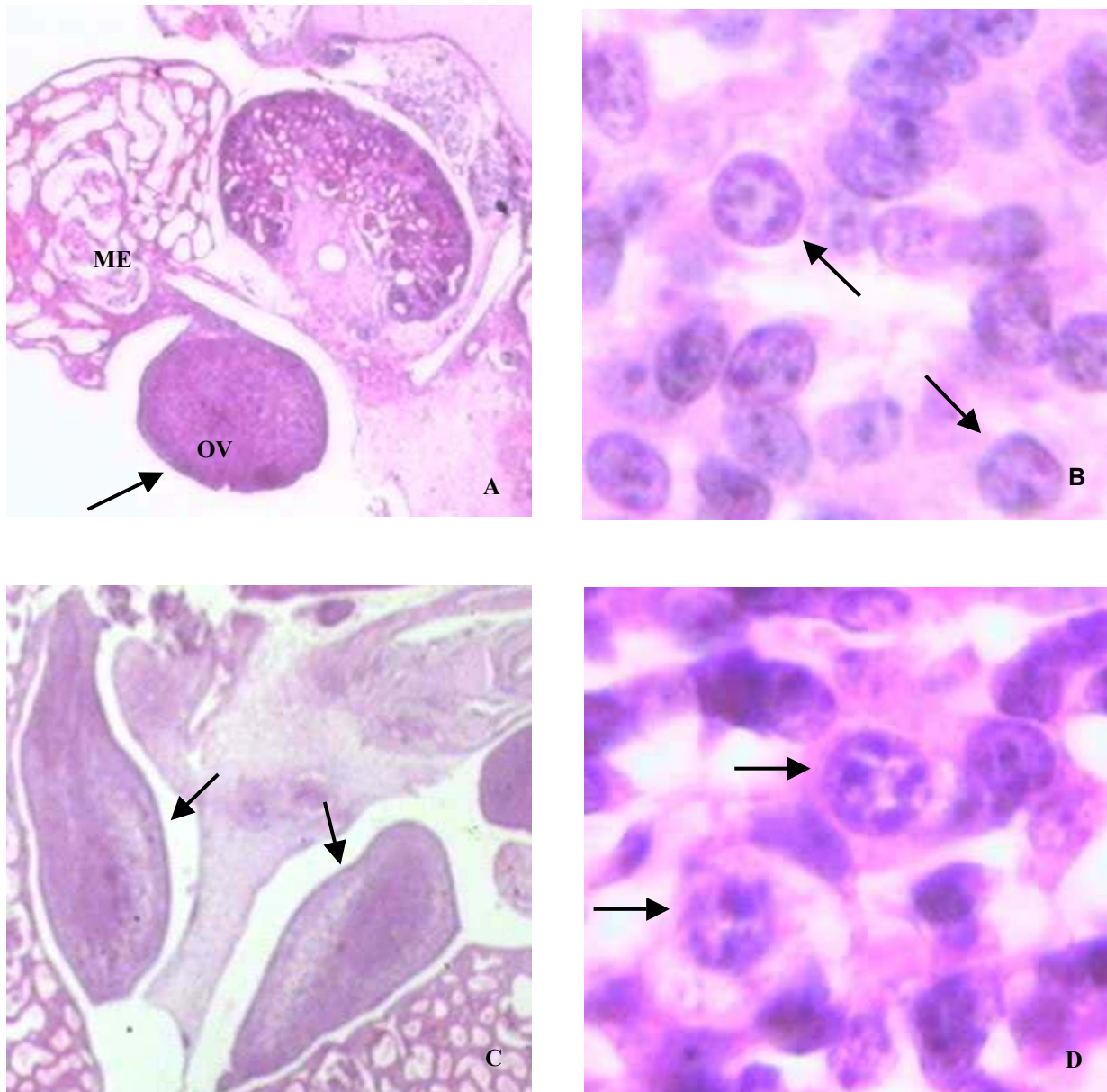


Figura 4: A; B embrião bovino da raça Nelore de 25mm (± 37 dias de gestação). Setas mostram gônada formada (A: 12,5x), OV (ovário), ME (mesonefro) e presença de CGP (B:400x). C; D embrião de 30mm (± 40 dias de gestação), mostrando (setas) gônadas (C: 12,5x) e CGP (D: 400x). HE.

Gráfico 1A = Número de Células Germinativas Primordiais de embriões bovinos da raça Nelore aos 34 e 40 dias após a fecundação.

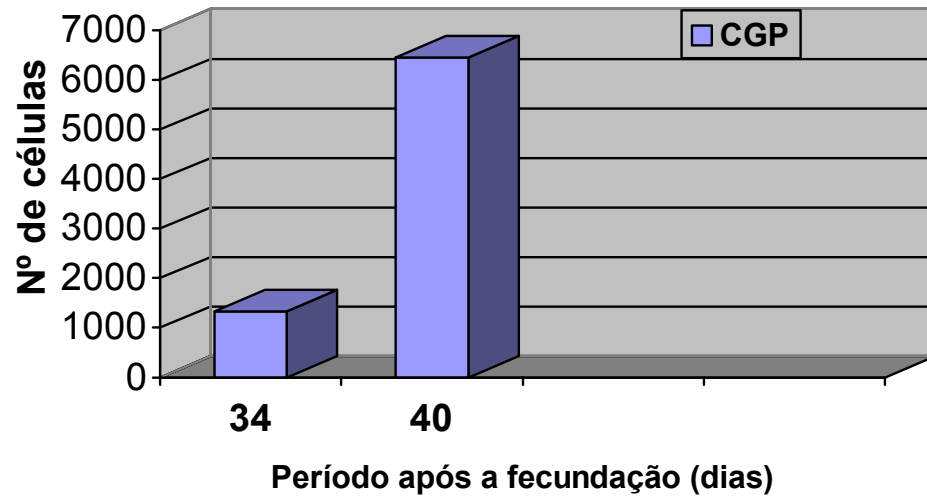
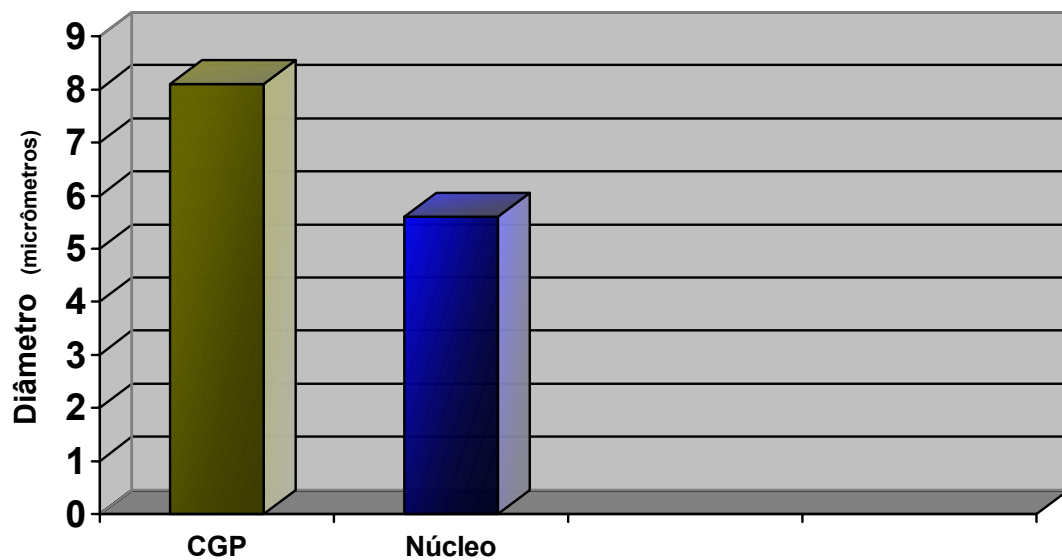


Gráfico 1B = Diâmetro médio das Células Germinativas Primordiais e de seus respectivos núcleos, de embriões bovinos da raça Nelore.



Oogênese.

As oogônias foram encontradas em fetos de 48 a 50 mm (\pm 50dias) nas regiões mais profundas do ovário, não havendo neste período distinção entre as regiões cortical e medular (figura 5A).

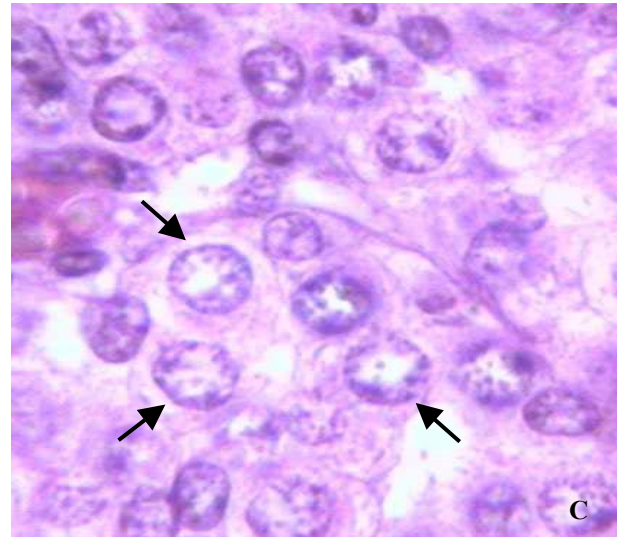
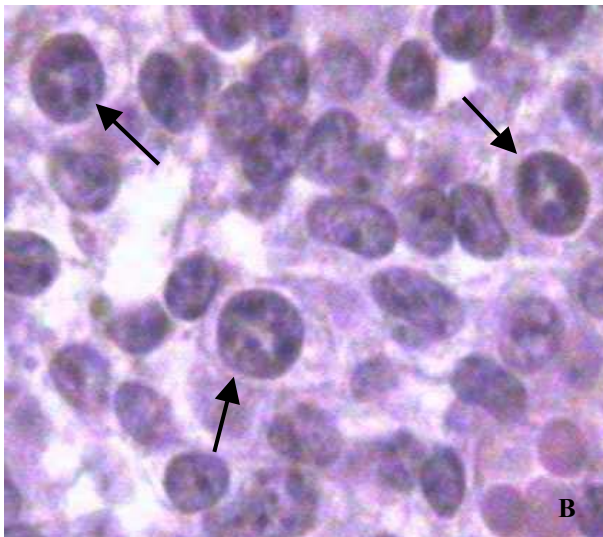
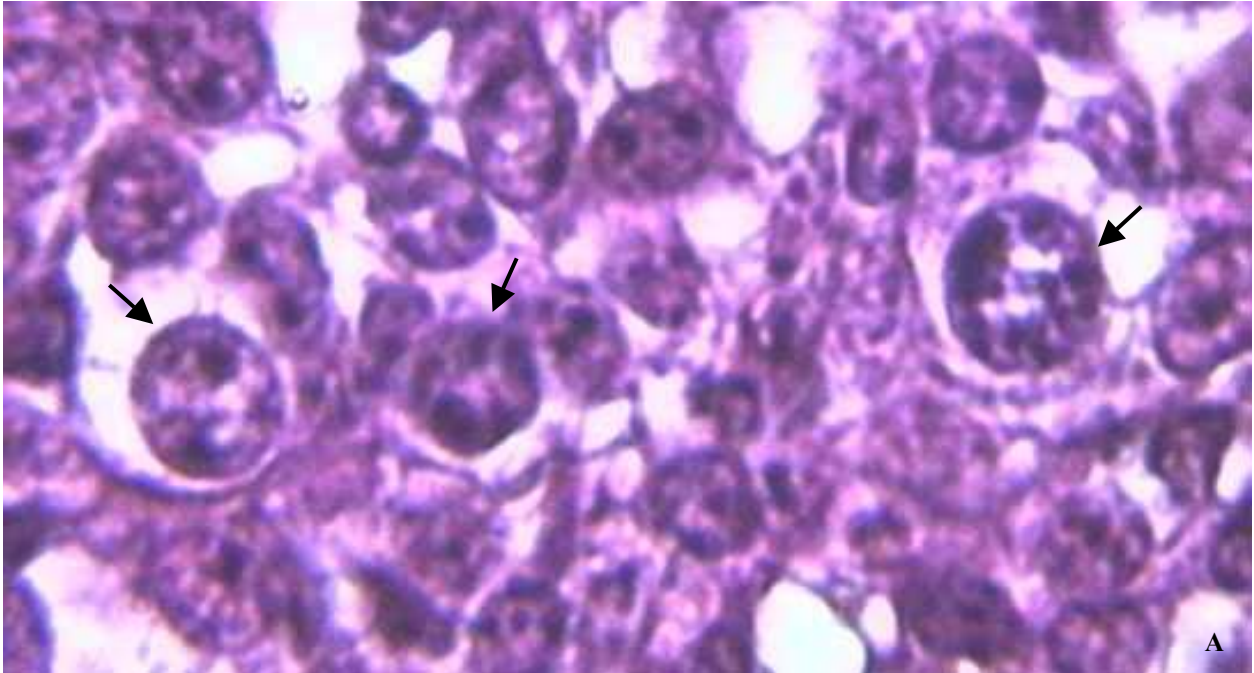


Figura 5: A: feto de 45mm (\pm 48 dias de gestação) – 480x. B: feto de 60mm (\pm 56 dias de gestação). C: feto de 85mm (\pm 66 dias de gestação)– 400x. Setas indicam presença de oogônias em interfase (A, B) e em mitose formando ninhos (C) – 400x. HE. Fetos bovinos da raça Nelore.

A tabela 2 apresenta o resultado das médias observadas das variáveis diâmetro da oogônia e do seu núcleo.

Tabela 2 -Diâmetro médio e desvio padrão (entre parênteses) das oogônias e do seu núcleo em fetos bovinos da raça Nelore nos vários períodos após a fecundação.

Dias após a fecundação	Número de células contadas	Diâmetro da oogônia (μm)	Diâmetro do núcleo (μm)
50	45	10,66 (0,63) _d	6,63 (0,49) _d
60	45	12,22 (0,73) _c	7,98 (0,58) _c
100	45	14,73 (1,07) _b	9,19 (0,87) _b
140	40	17,32 (1,28) _a	9,98 (0,80) _a

a, b, c, d médias com letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tokey ($P < 0,05$)

Nesta fase da oogênese houve um aumento expressivo no número destas células atingindo aproximadamente 130471 (tabela 1 e gráfico 2A). O diâmetro médio das oogônias neste período é de 10,66 μm e o núcleo, 6,63 μm (tabela 2 e gráfico 2B).

Gráfico 2A = Número de oogônias de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.

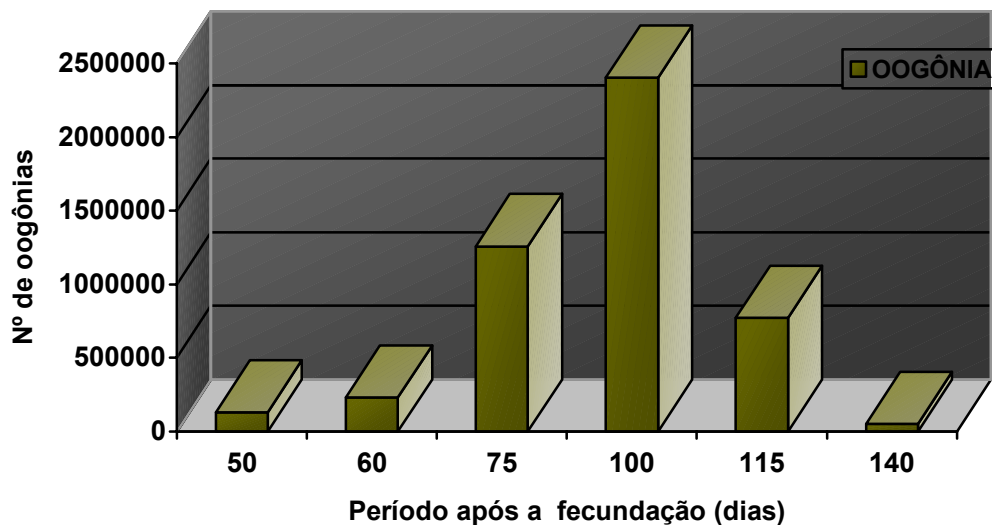
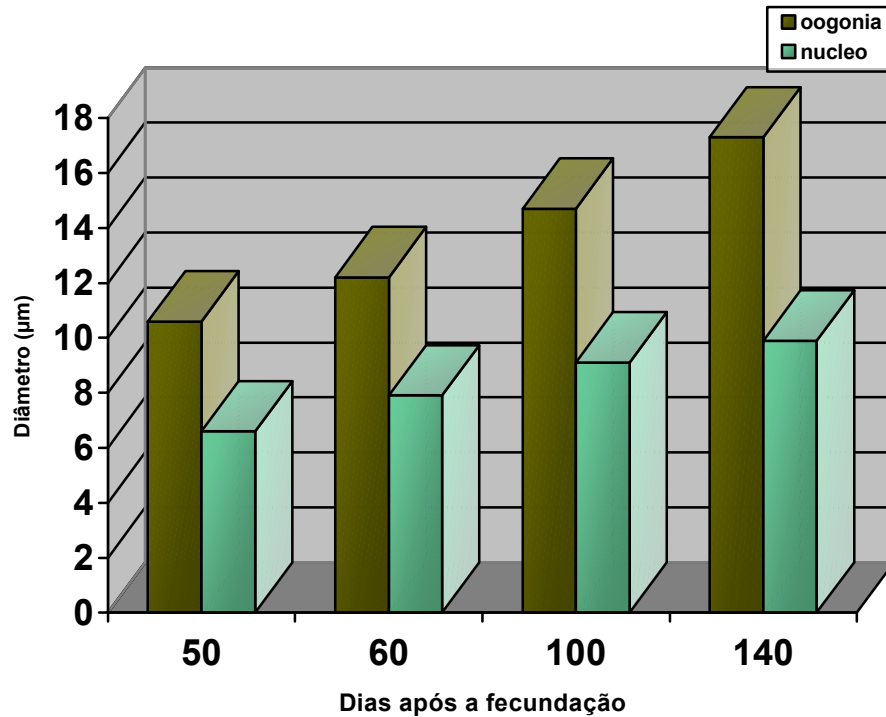


Gráfico 2B = Diâmetro médio das Oogônias e respectivos núcleos, em fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.



Em fetos de 70 mm (± 60 dias), foram identificadas em torno de 232319 oogônias (figura 5B) com pequeno aumento no diâmetro, de acordo com as tabelas 1 e 2 e os gráficos 2A e 2B. Pela Tabela 1 podemos observar o número de oogônias nos vários períodos de gestação até seu desaparecimento, que ocorre em fetos de ± 350 mm (140 dias). Estas células começam a arranjar-se em ninhos (figura 5C), sendo envolvidas por células do estroma ovariano. Em fetos de 90 a 100 mm (± 70 dias), é encontrado grande número de oogônias agrupadas em ninhos (figura 6A) e apresentando características de células em divisão.

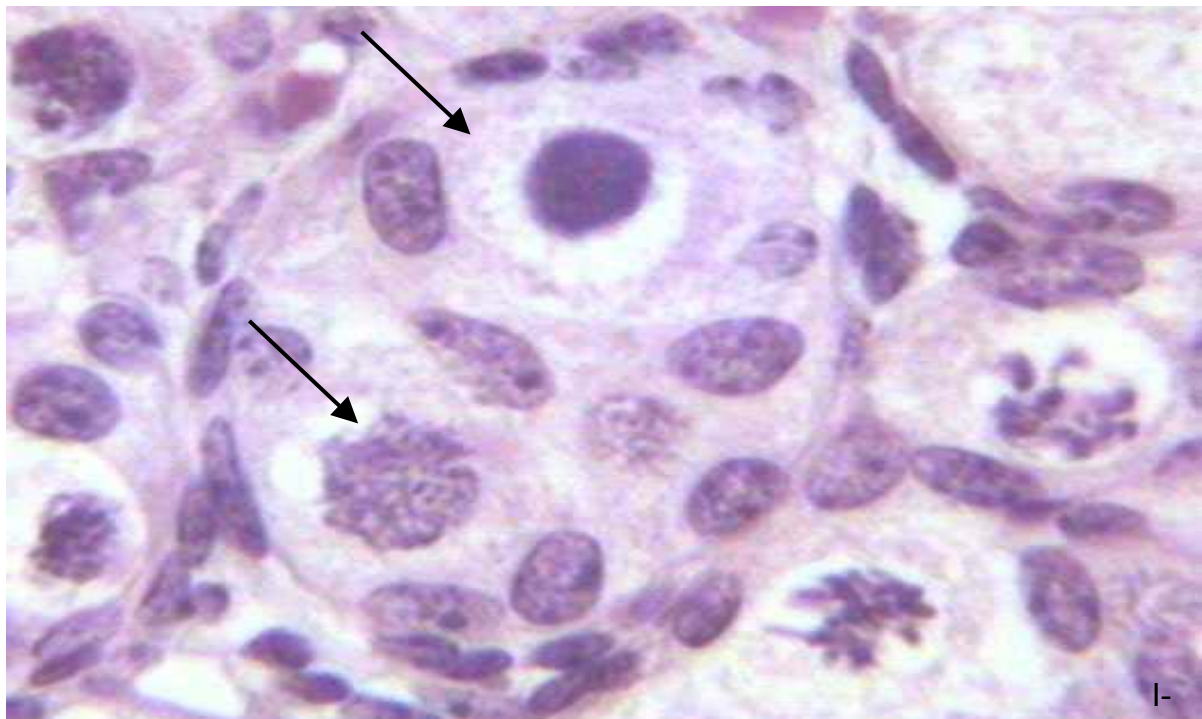
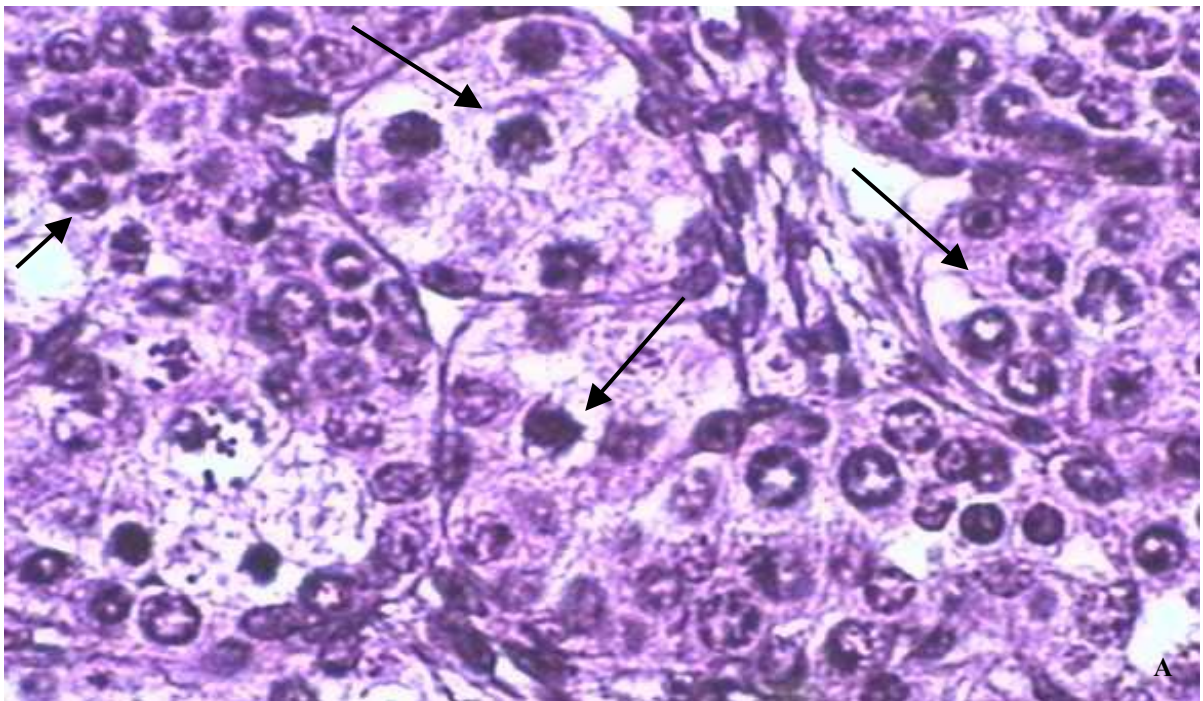


Figura 6: A: feto de 100mm (\pm 71 dias de gestação). B: feto de 140mm (\pm 85 dias de gestação). Setas indicam ninhos de oogônias (A) e oócitos em meiose contornados por células foliculares (B) – 400x. HE. Fetos bovinos da raça Nelore.

Em fetos de 110 mm (\pm 75 dias) foram encontradas 1259040 oogônias com aumento significativo no seu diâmetro. Número que aumenta ainda mais em fetos de 180 a 200 mm (\pm 100 dias), atingindo o máximo de 2403346 (tabela 1, gráfico 2A) e diâmetro médio de 14,73 (tabela 2, gráfico 2B). Além disso, em fetos de 140 a 150 mm (\pm 85 dias), oócitos em divisão meiótica são contornados por células foliculares iniciando a formação dos folículos primordiais (figura 6B). Neste período começa a distinção entre as regiões cortical e medular, com esta última praticamente não apresentando células germinativas. Em fetos com mais de 200 mm (acima de 100dias) há uma diminuição drástica no número de oogônias, conforme mostra a tabela 1 e o gráfico 2A atingindo a quantidade de 771263 células em fetos de 240 a 250 mm (\pm 115dias) e diminuindo ainda mais em fetos de 350mm (\pm 140dias), atingindo neste período o número de 51609 oogônias, não sendo mais observadas a partir daí.

Os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis diâmetro da oogônia (y_1) e diâmetro do núcleo (y_2) apresentaram valor de 0,8917 portanto correlação positiva e altamente significativa ($p < 0,01$). Os resultados da análise de variância estão contidos na tabela 3.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos diâmetros das oogônias (DO) e do núcleo (DN) de embriões e fetos bovinos da raça Nelore.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	DO	DN
Período após a fecundação	3	361,6943**	91,8437**
Resíduo	171	0,9156	0,5973
Total	174		
** P < 0,01		CV=7,0186	CV= 8,3909

FORMAÇÃO FOLICULAR

Folículos primordiais

Oócitos em meiose sendo contornados por células foliculares planas (figura 7) foram primeiro observadas em fetos de mais ou menos 140 mm (85dias), conforme mostra a fig.6B. Em fetos de 170mm (\pm 94dias), já estão totalmente formados, sendo encontrados principalmente nas regiões mais profundas do córtex ovariano (figuras 7A, 7C). Em fetos de 190mm (\pm 100 dias) foram encontrados 93806 folículos com diâmetro médio de 35,6 μ m, oócitos com 18,9 μ m e núcleo com 10,8 μ m (tabelas 1 e 5, figura 7B, gráficos 3A e 3B). A tabela 1 mostra o número de folículos primordiais, do seu início de formação até próximo ao final da gestação, enquanto a tabela 5 evidencia não só o seu diâmetro, mas também do oócito e do núcleo.

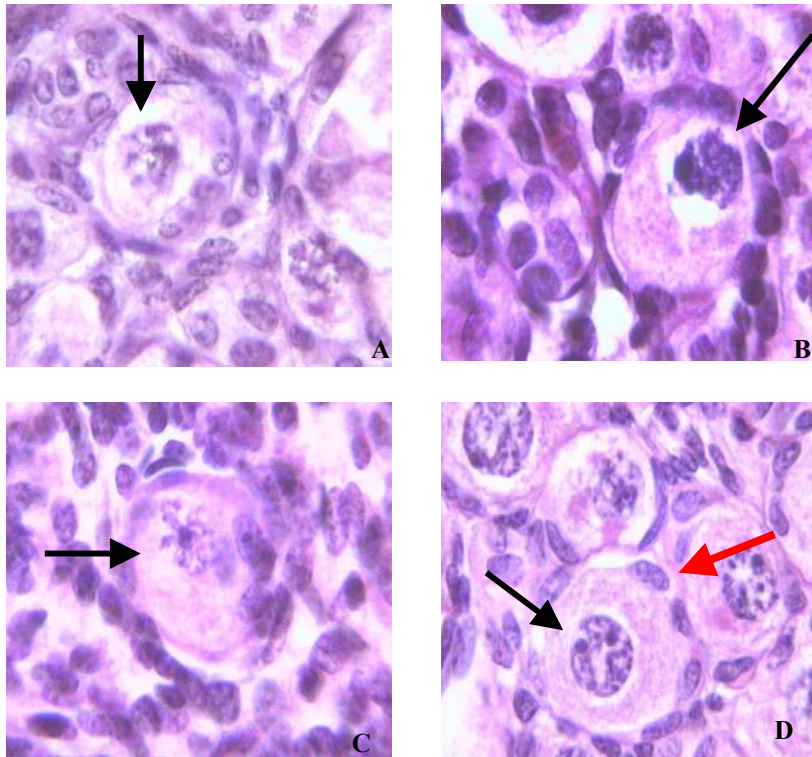


Figura 7: Folículos primordiais com oócitos em várias fases (setas) da prófase meiótica. Observar as células foliculares planas contornando os oócitos (seta vermelha). A, C: fetos de 170mm (\pm 94 dias de gestação). B: feto de 200mm (\pm 103 dias de gestação). D: feto de 260mm (\pm 119 dias de gestação). HE. 400x em fetos bovinos raça Nelore.

Gráfico 3A . Número de folículos primordiais de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.

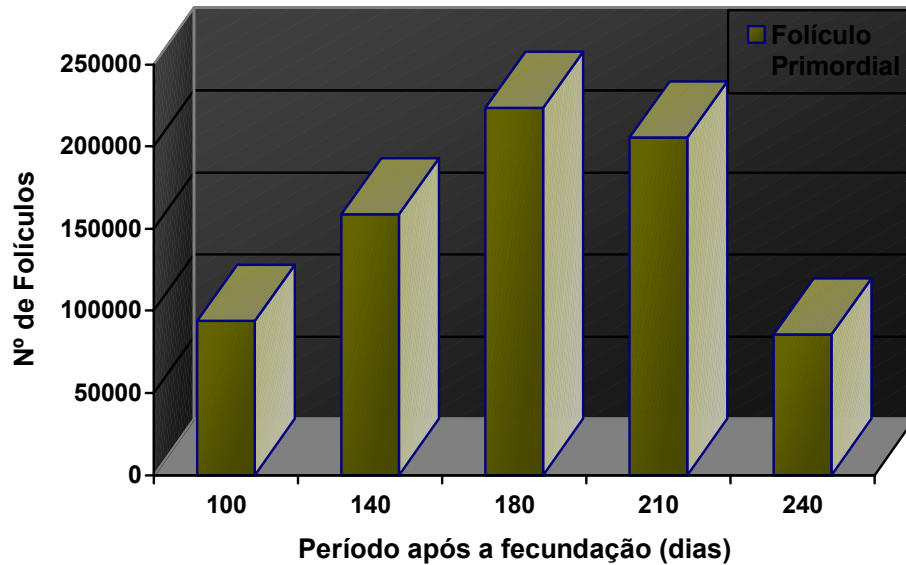
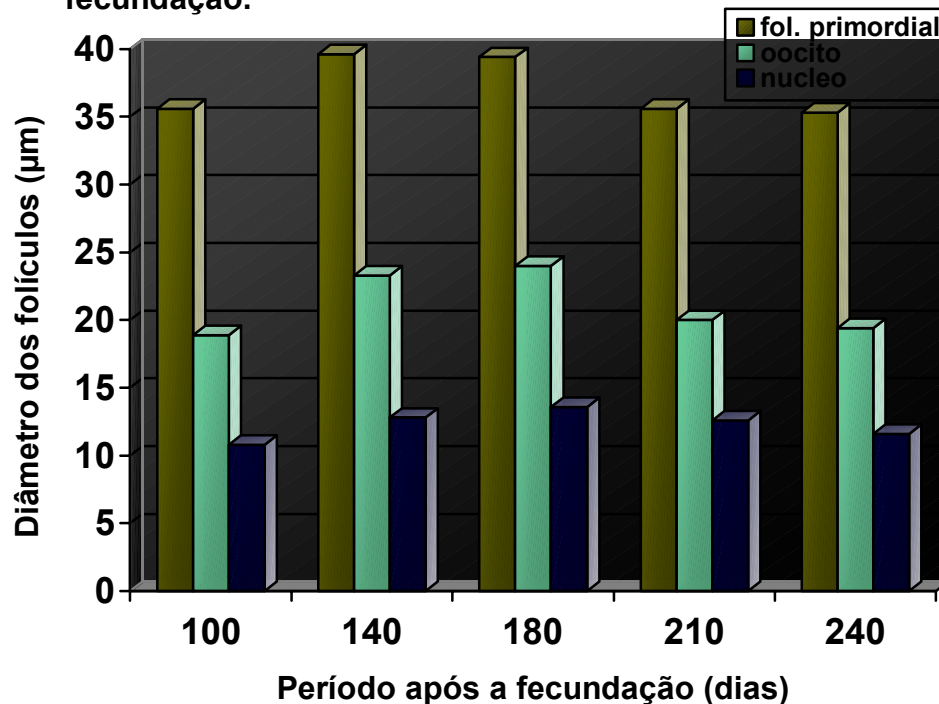


Gráfico 3B. Diâmetro médio dos folículos primordiais e de seus respectivos oócitos e núcleos, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.



Em fetos de 340 a 350 mm (\pm 140dias), folículos primordiais aumentaram em número e diâmetro (tabelas 1 e 5 e gráficos 3A e 3B), chegando a alcançar a casa dos 158465 com diâmetro médio de 39,6 μ m, 23,3 μ m e 12,8 μ m para os folículos primordiais, oócito e núcleo, respectivamente. Em fetos de 520 a 530mm (\pm 180dias) alcançaram o número de 223643 folículos primordiais apresentando também um pequeno aumento de diâmetro (39,4 μ m, 24,0 μ m, e 13,6 μ m), conforme mostram as tabelas 1 e 5 e os gráficos 3A e 3B. . Nesta fase os folículos primordiais somente foram localizados na região cortical da gônada com alguns apresentando células foliculares planas e cúbicas (figuras 8A, 8B), indicando ativação folicular. No último terço da gestação, em fetos a partir de 700 mm (\pm 210dias), seu número começa a cair (205505) e atinge números finais em fetos de 750 a 800 mm (85460), conforme pode ser visto na tabela1 e gráficos 3A e 3B, com ligeiro declínio no seu diâmetro (tabela 5). Nesta fase, foram encontrados exclusivamente na periferia do córtex ovariano.

As médias observadas das variáveis diâmetro dos folículos, do seu oócito e do respectivo núcleo são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Diâmetro dos folículos primordiais, do seu oócito e do núcleo (desvio padrão entre parênteses) de fetos bovinos da raça Nelore nos vários períodos após a fecundação

Dias após a fecundação	Número de células medidas	Diâmetro do folículo (μm)	Diâmetro do oócito (μm)	Diâmetro do núcleo (μm)
100	44	35,63(6,64) _b	18,95(3,49) _b	10,87(1,60) _c
140	45	39,64(3,61) _a	23,37(3,34) _a	12,82(2,16) _a
180	30	39,42(7,15) _a	24,03(6,14) _a	13,65(2,21) _a
210	30	35,64(2,35) _b	20,05(0,96) _b	12,68(0,96) _{ab}
240	31	35,38(2,26) _b	19,37(1,60) _b	11,55(1,20) _{ac}

a, b, c médias com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis diâmetro do folículo primordial (y_1), diâmetro do oócito (y_2) e do núcleo (y_3) são positivos e altamente significativos sendo apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis diâmetro do folículo primordial (y1), diâmetro do oócito (y2) e do núcleo (y3) em fetos bovinos da raça Nelore.

	Y2	Y3
Y1	0,7598**	0,5693**
Y2		0,7005**
Y3		

Correlação positiva e significativa (P<0,01)

A tabela 6 mostra o resultado da análise de variância dos diâmetros do folículo primordial do seu oócito e do núcleo deste.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância dos diâmetros do folículo primordial (DF), do seu oócito (DO) e do núcleo (DN) de fetos bovinos da raça Nelore.

Fontes de variação	GL	DF	DO	DN
Período após fecundação	4	176,1660**	204,4940**	44,3705**
Resíduo	175	24,4246	12,6829	3,0227
Total	179			

** P<0,01

CV=13,27

CV=16,82

CV=14,19

Folículos em crescimento

As médias observadas das variáveis diâmetro dos folículos em crescimento, do seu oócito e respectivos núcleos são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Diâmetro do folículo em crescimento, do seu oócito e do núcleo (desvio padrão entre parênteses), de fetos bovinos da raça Nelore nos vários períodos após a fecundação.

Período após a fecundação	Número de células medidas	Diâmetro do folículo (μm)	Diâmetro do oócito (μm)	Diâmetro do núcleo (μm)
140	44	46,22(4,59) ^a	26,60(2,71) ^a	14,19(1,51) ^a
180	30	45,37(4,67) ^a	25,90(2,69) ^a	13,72(0,98) ^a
210	28	45,35(4,90) ^a	24,84(2,62) ^b	13,80(1,01) ^a
240	31	45,71(5,04) ^a	26,55(2,75) ^{ab}	13,83(0,90) ^a

a,b médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Folículos primários (com uma única camada de células foliculares cúbicas) e folículos secundários (mais de uma camada de células foliculares cúbicas, sem indício de formação do antro), são aqui denominados folículos em crescimento. Estes tipos de folículos foram primeiramente encontrados nas camadas profundas do córtex ovariano em fetos de 350mm em número de 63339 com diâmetro de 46,2μm, 26,6μm e 14,2μm dos folículos, oócito e núcleo, conforme mostram as tabelas 1 e 9, os gráficos 4A e 4B. Aumentaram em número nos fetos de 520 a 530mm (± 180 dias) atingindo a marca de 163216 folículos (tabela 1) e, segundo as figuras 8C, 9A e 9B, surgiram os primeiros sinais de formação da zona pelúcida. Em fetos a partir de 700mm (± 210 dias) continuaram a aumentar ao contrário do que ocorre com os folículos primordiais, alcançando o número de 247696 folículos para então reduzirem seu número em fetos de 750 a 800mm (± 240 dias), para 81135 folículos. O diâmetro dos folículos em crescimento, à exceção do diâmetro do seu oócito que apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de 140 e 210 dias após a fecundação, e do núcleo, não apresenta modificações significativas nas várias fases, de acordo com a tabela 9 e gráfico 4B. Nas duas últimas fases estes folículos foram encontrados na camada intermediária do córtex ovariano.

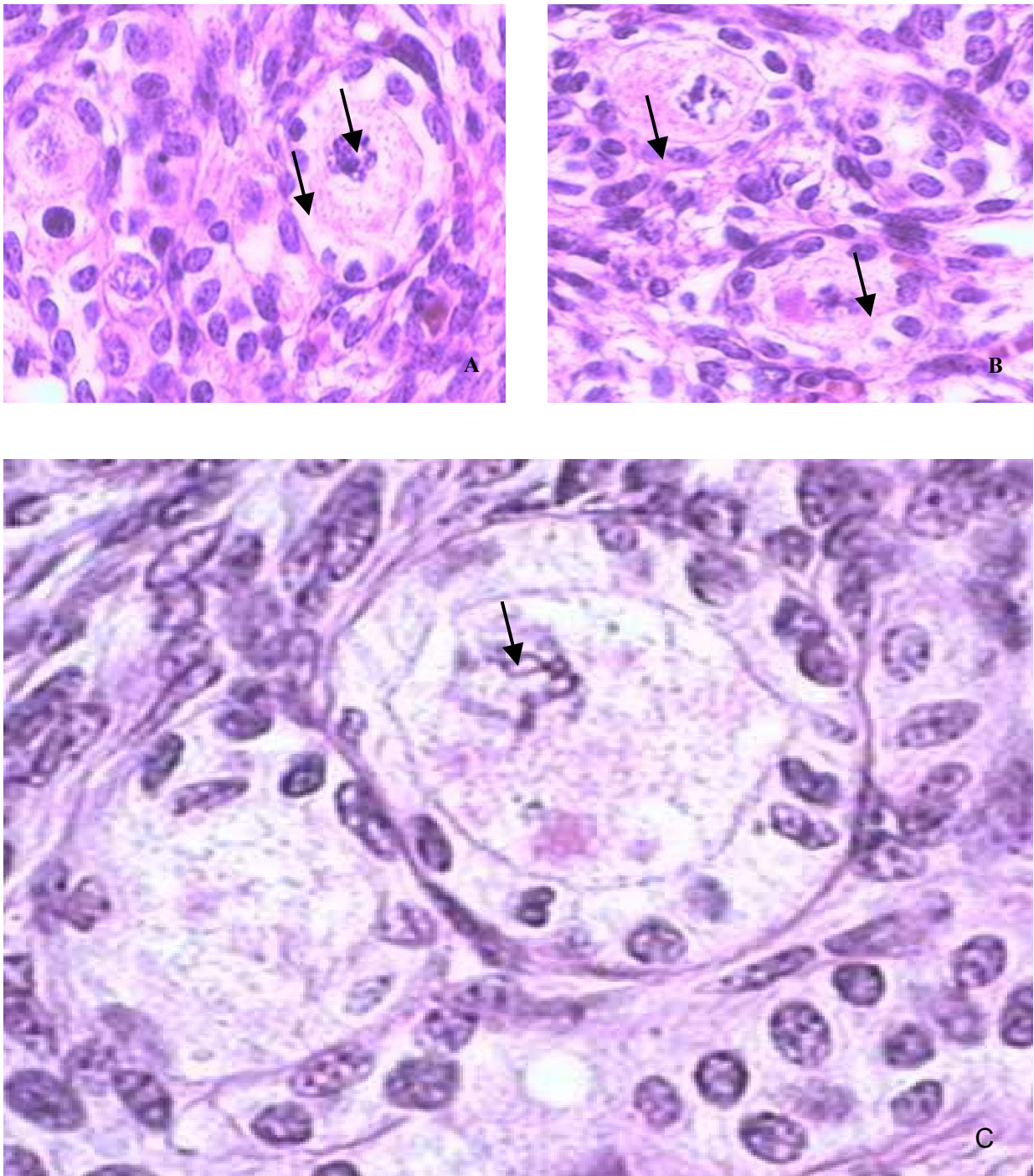


Figura 8: A; B: fetos bovinos da raça Nelore de 525mm (\pm 179 dias de gestação), folículos primordiais com oócitos em estágio dictiótено e células foliculares passando da forma plana para a cúbica. C: feto bovino da raça Nelore de 520mm (\pm 178 dias de gestação), folículo primário com oócito em estágio dictiótено, mostrando início da formação da zona pelúcida. HE. 400x.

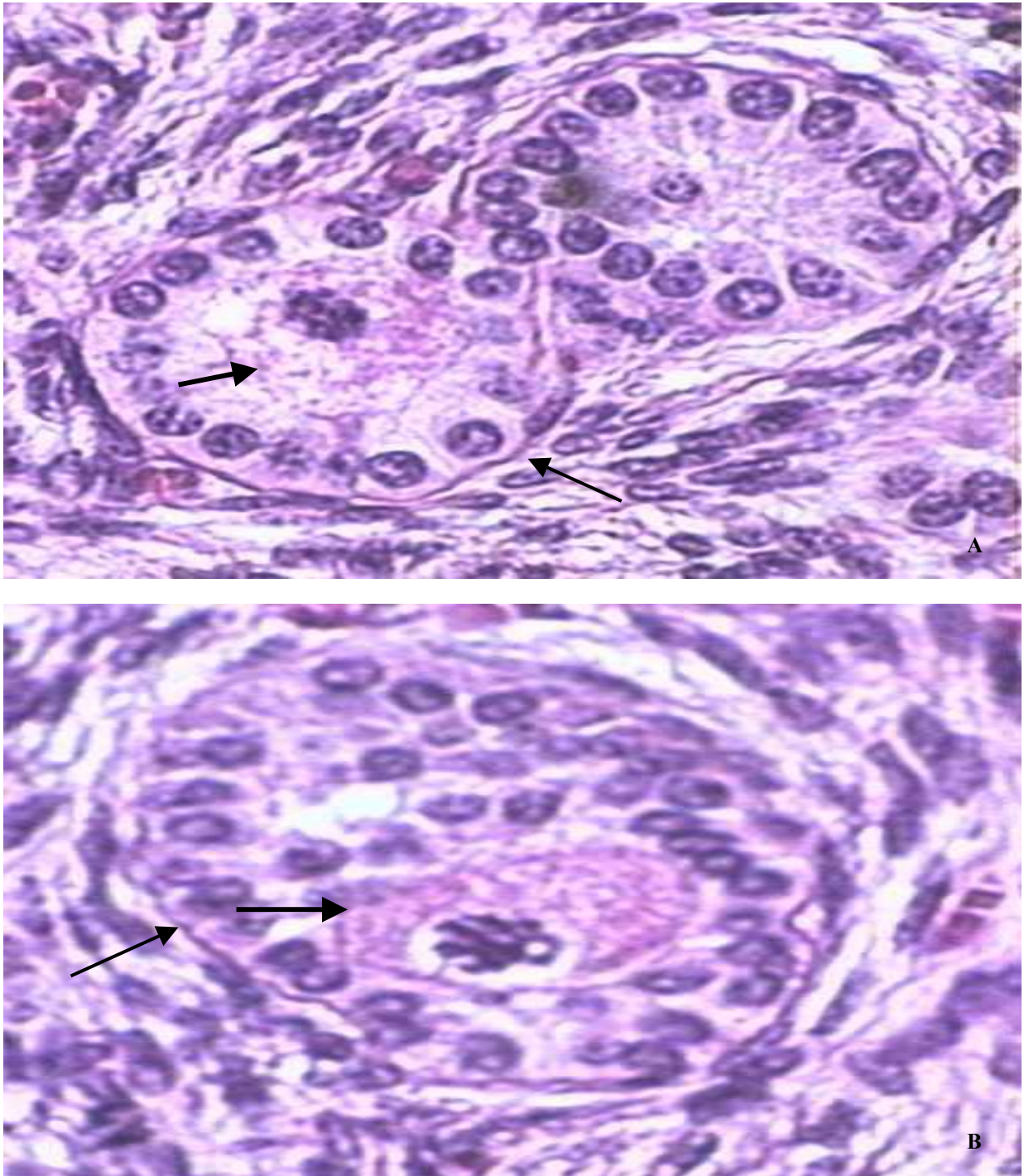
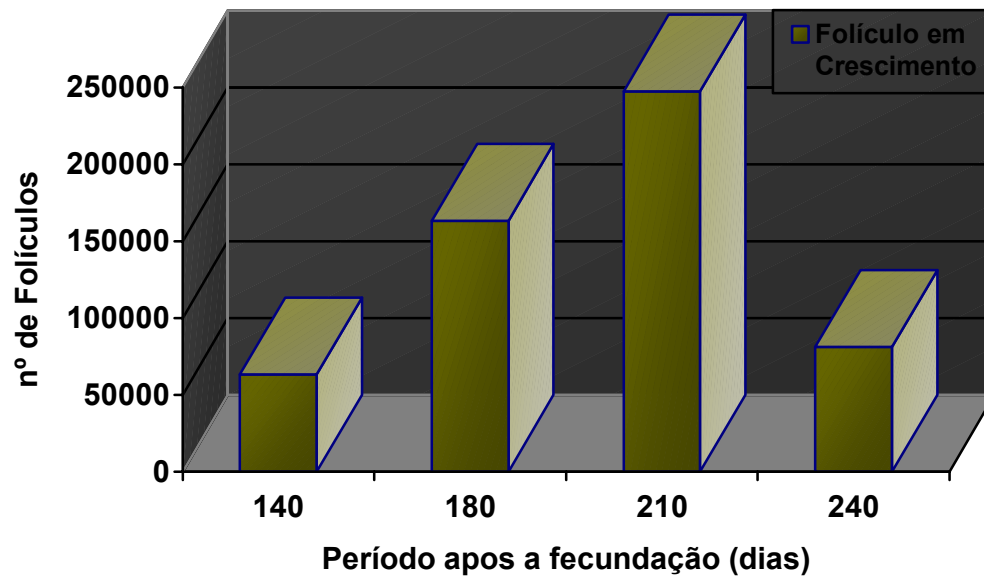


Figura 9: A, B: Fetos bovinos da raça Nelore de 590mm (\pm 192 dias de gestação). A: folículos primários, com uma camada de células foliculares cúbicas e início de formação da zona pelúcida (setas). B: folículo com mais de uma camada de células cúbicas, evidenciando o limite entre o epitélio folicular e o estroma ovariano e início da formação do antro (A, B setas). HE. 400x.

Gráfico 4A. Número de folículos em crescimento, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.



Os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis diâmetro do folículo em crescimento, diâmetro do oócito e do núcleo são apresentados na tabela 8.

Gráfico 4B. Diâmetro médio dos folículos em crescimento e de seus respectivos oócitos e núcleos, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.

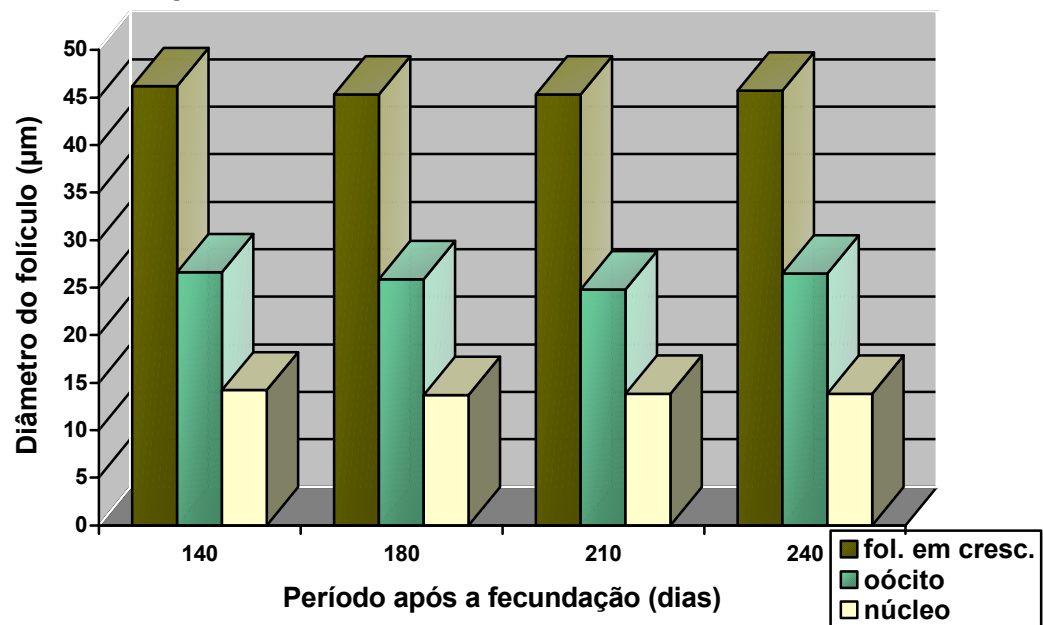


Tabela 8 – Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis diâmetro do folículo em crescimento (y1), diâmetro do oócito (y2) e do núcleo (y3) dos folículos em crescimento de fetos bovinos da raça Nelore.

	Y1	Y2	Y3
Y1		0,5402**	0,3054**
Y2			0,4070**
Y3			

** correlação positiva e significativa (P<0,01)

A tabela 9 mostra o resultado da análise de variância para os diâmetros do folículo em crescimento, do seu oócito e respectivo núcleo.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para os diâmetros do folículo em crescimento (DF), do seu oócito (DO) e do núcleo (DN) em fetos bovinos da raça Nelore.

Fontes de variação	GL	DF	DO	DN
Período após a fecundação	3	6,1835ns	20,7977*	1,6634ns
Resíduo	129	22,8868	7,2804	1,3867
Total	132			
		CV= 10,46	CV= 10,35	CV=8,45

Folículos antrais

Nesta categoria foram incluídos folículos secundários com evidências de formação do antro e folículos com antro totalmente formado (folículo terciário).

Os primeiros folículos antrais foram encontrados nas regiões mais profundas do córtex ovariano em fetos de 520 a 530 mm (\pm 180dias). Nesta fase alguns folículos apresentaram zona pelúcida e antro em formação (figuras 9B,10A, 10B e 10C), outros,

zona pelúcida totalmente formada e oócitos circundados pelas células do cumulus oophorus (fig.10C). Neste período foram encontrados cerca de 25.328 folículos (tabela1 e gráfico 5A). O diâmetro dos mesmos, bem como os dos oócitos e respectivos núcleos estão contidos na tabela 13 (ver também gráfico 5B).

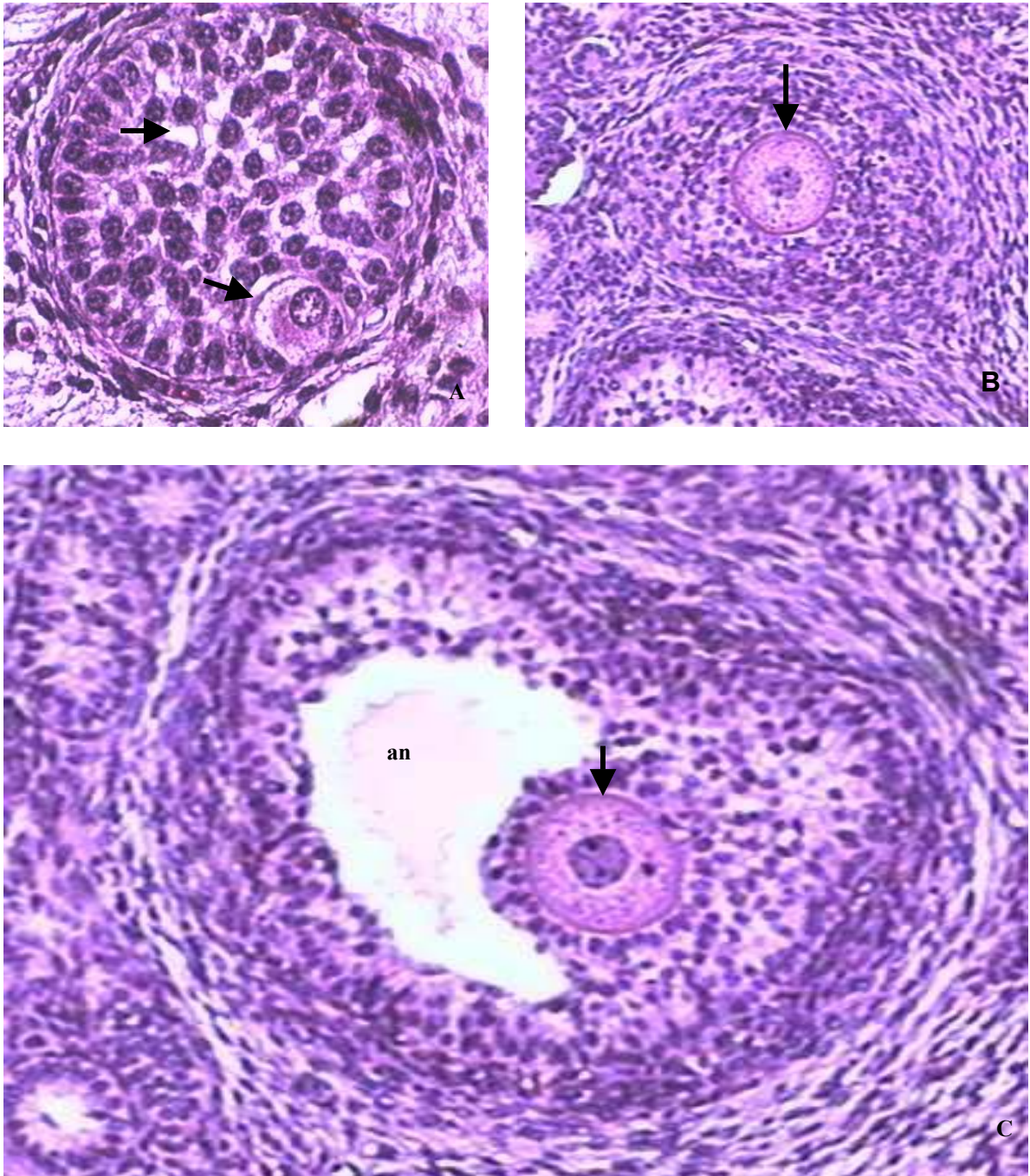


Figura 10: A, B, C: Fetos bovinos da raça Nelore de 555mm (\pm 184 dias de gestação). A, B: folículos com várias camadas de células cúbicas, antro em formação e zona pelúcida evidente (setas). C: antro formado (an) e oócito contornado por nítida zona pelúcida (setas). HE. 400x.

Estes folículos diminuem em número em fetos acima de 700mm conforme mostram a tabela 1 e o gráfico 5A, e aumentam significativamente seu diâmetro, assim como o do oócito e do respectivo núcleo (tabela10, figura 11, gráfico 5B). No final da gestação são encontrados folículos com sinais de possível atresia conforme mostra a figura 11C.

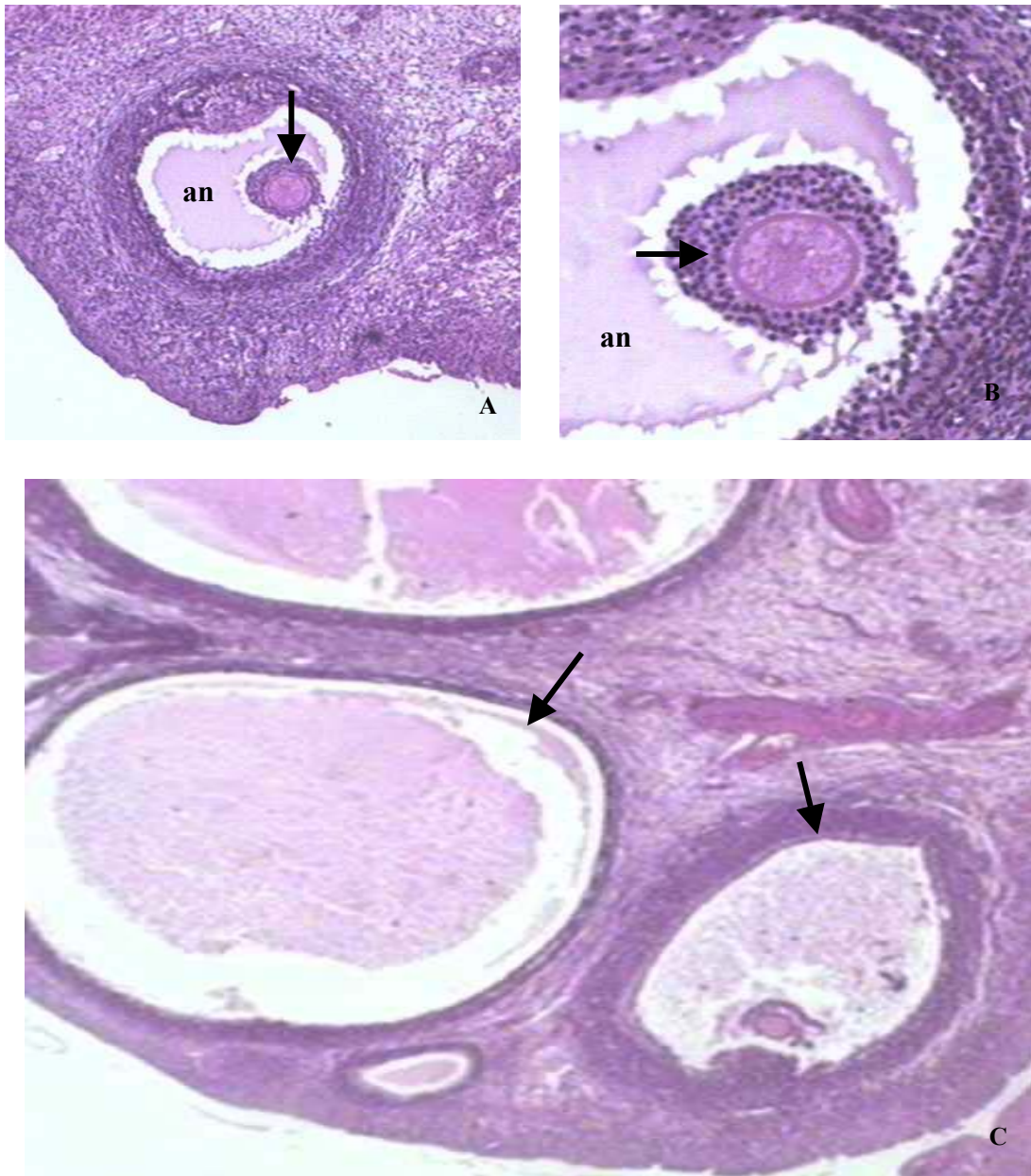
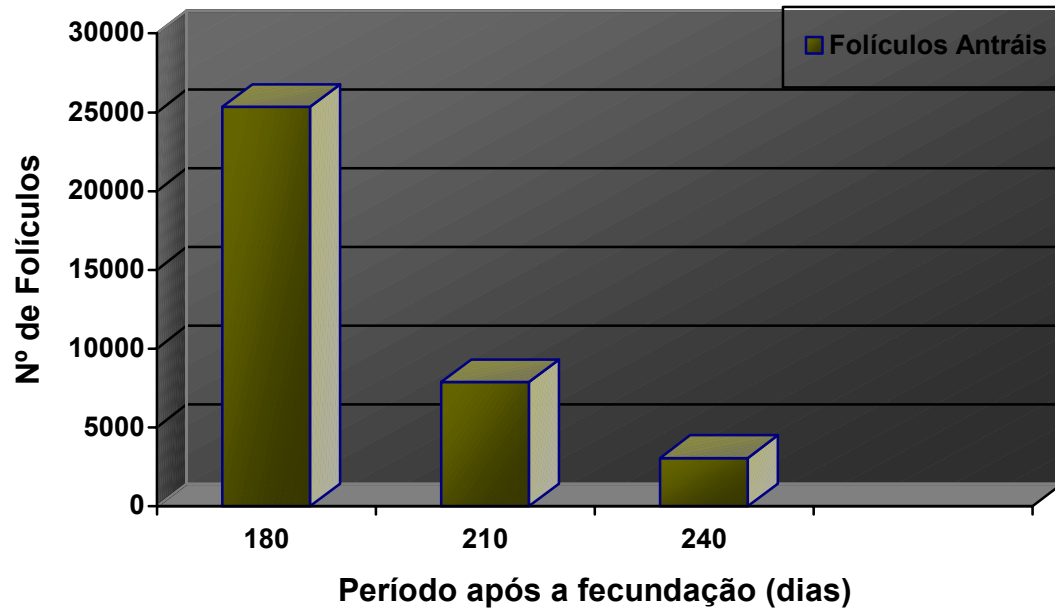


Figura 11: A, B: fetos de 690mm (\pm 211 dias de gestação), com antro amplo (an), oócito circundado pela zona pelúcida e várias camadas de células do cumulus oophorus (seta). C: feto de 750mm (\pm 240 dias de gestação), grandes folículos antrais (setas). HE. 400x.

Gráfico 5A. Número de folículos antrais, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.



Devido ao seu grande tamanho estes folículos ocupam praticamente todo o estroma ovariano.

Gráfico 5B. Diâmetro médio dos folículos antrais e de seus respectivos oócitos e núcleos, de fetos bovinos da raça Nelore, nos vários períodos após a fecundação.

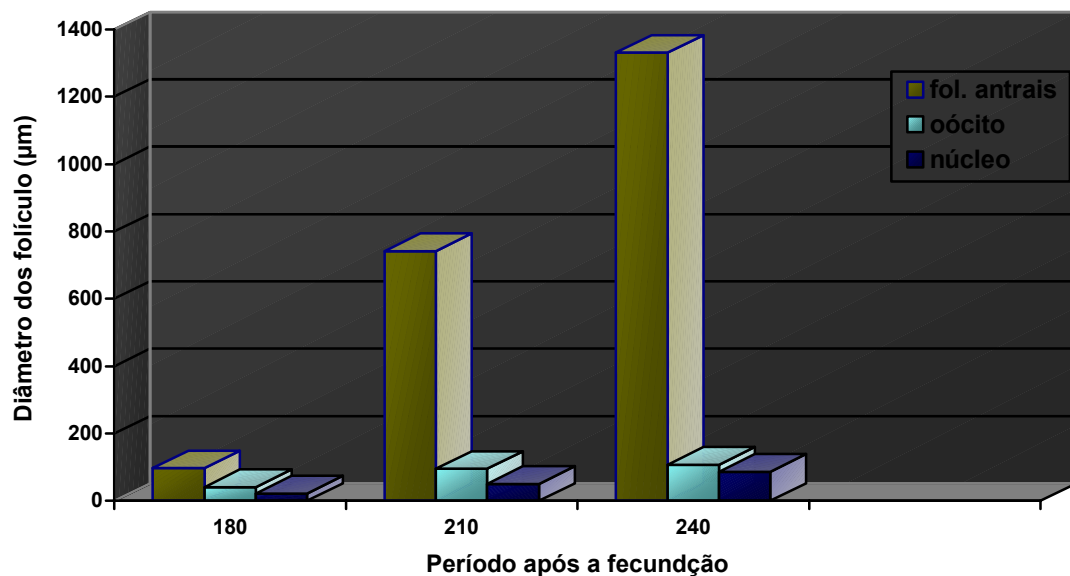


Tabela 10 – Diâmetro médio dos folículos antrais, do seu oócito e núcleo (desvio padrão entre parênteses), de fetos bovinos da raça Nelore nos vários períodos após a fecundação.

Período após a fecundação (dias)	Diâmetro dos folículos (μm)	Diâmetro dos oócitos (μm)	Diâmetro dos núcleos (μm)
180	96,92 (31,07)	41,52 (6,81)	22,51 (2,97)
210	742,00 (402,53)	95,81 (18,430)	50,63 (14,56)
240	1331,43 (567,43)	107,65 (14,41)	87,40 (15,16)

V. DISCUSSÃO

Os embriões e fetos bovinos da raça Nelore foram retirados do útero materno logo após o abate das fêmeas e medidos em sentido crânio-caudal para cálculo da sua idade. Na fase final do período pré-natal, o comprimento fetal aplicado à fórmula proposta por REXROAD et al. (1974) mostrou idade gestacional inferior à esperada em função das características apresentadas pelas fêmeas antes do abate, diferenças atribuídas ao menor comprimento dos fetos zebuínos em relação aos fetos taurinos. Estas observações estão de acordo com as feitas por MBASSA (1989) quando considerou que o surgimento precoce de folículos antrais em fetos zebuínos poderia ser consequência do menor comprimento destes, em relação aos fetos taurinos.

A formação dos ovários em embriões e fetos da raça Nelore ocorre de forma muito parecida a de embriões e fetos taurinos e também à de outros mamíferos, especialmente camundongos, suínos, ovinos e na própria espécie humana. As gônadas aparecem junto ao mesonefro, confirmando observações feitas por vários autores (MATSCHKE & ERICKSON 1969, PELLINIEMI 1976, MACKAY 2000, MCLAREN 2000)

Neste estudo, a crista gonádica foi observada pela primeira vez em embriões de 12 a 15mm de comprimento (\pm 29 a 31 dias) ratificando resultados de vários trabalhos não só em fetos de bovinos, mas também em outros mamíferos (ERICKSON, 1966, GROPP & OHNO, 1966, MATSCHKE & ERICKSON, 1969, WROBEL & SÜB, 1998). No entanto, estes dados não confirmam as informações de FUJIMOTO et al. (1977) e NODEN & DE LAHUNTA (1990) quando indicaram que nas várias espécies de mamíferos a crista gonádica iniciava-se em embriões de 9 a 10mm (\pm 27 dias), provavelmente pelo fato de os autores terem estudado fetos de ambos os sexos, já que há indícios apontando para maior precocidade em fetos masculinos.

Apesar de a crista gonádica ter se formado antes, CGP foram encontradas somente em embriões de 20 mm (\pm 34 dias), confirmando estudos de SHIM & ANDERSON (1998), quando afirmaram que, em período correspondente, as CGP podiam ser identificadas por suas características morfológicas em camundongos, ratos, coelhos, bovinos e humanos. Tal fato foi também verificado neste estudo ao observar as seguintes características: Células grandes, arredondadas, com muito citoplasma que

se cora pouco, bem delimitado de outros tipos celulares, núcleo grande, redondo e localizado no centro da célula.

Nesta fase foram observadas 1331 células, constituindo um número semelhante ao encontrado em embriões humanos de cinco semanas (1000 a 2000) conforme citado por BAKER (1966), BYSKOV (1982), FUJIMOTO et al (1985) e GODIN et al (1990). Em embriões de 25 a 30mm (\pm 40 dias) a gônada, onde foram encontradas 6455 CGP neste período, está completamente formada. Este número foi bem diferente dos citados por MINTZ (1959) em camundongos, porém semelhante aos de WROBEL & SÜB (1998) quando afirmaram que aos 32 dias a crista gonádica expandia-se rapidamente formando a gônada indiferenciada, em forma de fuso, fixa à região do mesonefro por zona de ligação abrangente. Nesta zona, mais tarde, a ligação se diferenciava em pedúnculo caudal, o que, de acordo com a figura 4A foi observado neste estudo, que também concorda com os resultados obtidos por JOST & PRÉPIN (1966) e ERICKSON (1966) quanto à afirmação de que a diferenciação sexual ocorria aos 40 dias, período em que a gônada está completamente formada e a albugínia podia ser observada na gônada masculina.

Em fetos de 48 a 50 mm (\pm 50 dias) surgiram as primeiras oogônias identificadas, devido ao seu grande tamanho e à forma esférica com o núcleo contendo filamentos finos e dois ou mais nucléolos proeminentes, como definido por BEAUMONT & MANDL (1962). O surgimento das oogônias, que estavam mais concentradas na região mais profunda da gônada (OHNO & SMITH, 1964), foi associado com um aumento expressivo no número destas células, o que foi confirmado neste estudo e nos trabalhos descritos por PETERS (1970), MOUSTAFA & HAFEZ (1971) e MEDEIROS E YAMAMOTO (1998).

Em fetos de 70 mm (\pm 60 dias) as oogônias aumentam em número e diâmetro (tabelas 1 e 2) e começam a agrupar-se em ninhos, fato também observado por GONDOS et al. (1971), MEDEIROS & YAMAMOTO (1998), com a afirmação de que a posterior fragmentação destes ninhos ou aglomerados celulares dava origem aos folículos primordiais. Estas células dispostas em ninhos passam por um grande aumento em seu número, a partir de fetos de 100 mm (\pm 70dias) atingindo seu ponto máximo nos de 180 a 200mm (\pm 100 dias), o que corrobora as afirmativas de PETERS

(1970) e MOUSTAFA & HAFEZ (1971). No entanto, ERICKSON (1966) afirmou também que as oogônias sofriam um grande aumento refletido por divisão mitótica a partir de 50 dias atingindo o ponto máximo aos 110 dias e caindo abruptamente a partir daí, fato com que concordamos e pudemos comprovar neste estudo, apesar da diferença em alguns dias mais tarde (± 115 dias ou fetos de 240 a 250 mm). A mitose destas células continuou até os noventa dias caindo drasticamente a partir daí, conforme relatado por MEDEIROS & YAMAMOTO (1998) em concordância com BEUMONT & MANDL (1962), em estudos com ratos e ERICKSON (1966), com bovinos, esta queda no número de oogônias se deu tanto por atresia como por apoptose. Os dados deste estudo apontam para uma grande redução do número de oogônias próximo ao período de formação de folículos primordiais indicando que o início da meiose e, portanto, o surgimento de oócitos são estádios altamente frágeis no desenvolvimento destas células.

De acordo com PETERS (1970), a oogênese, isto é, a transformação da oogônia em oócitos ocorreu em certo tempo durante o desenvolvimento do animal. Seu início e final, aconteceram inteiramente dentro do período fetal (camundongos, bovinos, suínos, ovinos e homem), inteiramente dentro do período neonatal (coelhos, furão e hamster dourado) ou começaram no feto e terminaram durante o período neonatal (gato). Em geral, pode-se afirmar que a oogênese é limitada a um período bem definido na vida do animal, fato também enfatizado por este estudo ao mostrar que a oogênese em bovinos da raça Nelore aconteceu totalmente dentro do período fetal seguindo o mesmo perfil de desenvolvimento de bovinos de raças européias e de várias outras espécies de mamíferos

Procurou-se mostrar também que, durante o período em que as oogônias estão agrupadas em ninhos, elas são contornadas por células cúbicas que passam para planas quando o folículo primordial começa a se formar. No entanto, estas observações não foram citadas na literatura consultada indicando a necessidade de um maior aprofundamento em estudos visando à sua confirmação.

Em fetos de 180 a 200mm (± 100 dias) os folículos primordiais estão totalmente formados, concordando com GROPP & OHNO (1966), principalmente por afirmarem que o surgimento destes folículos se dava primeiro nas camadas mais profundas da zona cortical. Também MOUSTAFA & HAFEZ (1971) encontraram folículos primordiais

sendo formados em fetos bovinos de três meses de idade, apesar da afirmação de que grande número destes folículos somente foram observados a partir de 175 dias. Mais tarde, no desenvolvimento, vários folículos primordiais, antes contornados somente por células foliculares planas, apresentaram algumas células cúbicas em seu contorno juntamente com outras células foliculares planas, indicando que estes folículos, por processos ainda desconhecidos, foram ativados para iniciar seu desenvolvimento e se transformarem em folículos primários. O destino final desses folículos primordiais que iniciaram seu desenvolvimento foi o seu desaparecimento por atresia ou apoptose como ocorreu também com as oogônias. Entretanto, nossas observações diferem das afirmativas de ORTIZ (1945) e ERICKSON (1966), que mostraram a formação dos folículos primordiais em bovinos, ocorrendo entre 160 e 170 dias após fecundação.

Além disso, encontrou-se também, resultados diferentes dos mostrados por MBASSA (1989) quando afirmou que os folículos primordiais em fetos de raças zebuínas eram formados quando estavam com 60 a 80 mm (\pm 60 dias) e por MEDEIROS & YAMAMOTO (1998) quando afirmaram que, em fetos humanos, os folículos primordiais se formariam entre a 8^a e 10^a semana, ocorrendo uma perda maciça destes folículos a partir da 2^a metade da gestação. Verificamos um aumento dos folículos primordiais a partir de 100 dias, com estes atingindo número máximo aos 180 dias, e iniciando a redução do seu número a partir de 210 dias, para finalmente alcançar números finais aos 240 dias. Estes folículos primordiais, resultantes do grande consumo que ocorreu neste período, formarão a população de folículos primordiais contidos no ovário após o nascimento.

Nossos resultados contrastaram também com os de ORTIZ (1945), quando afirmou que folículos primários de fetos bovinos foram observados aos 170 dias, já que estes folículos foram detectados em fetos de 350mm (\pm 140 dias) atingindo número máximo aos 210 dias (fetos de \pm 700mm) e caindo abruptamente aos 240 dias (fetos de \pm 800mm).

Folículos antrais foram observados neste estudo em fetos de 520 a 530 mm (\pm 180 dias) portanto, diferentes de resultados de ERICKSON (1966), que mostrou o aparecimento desses folículos a partir de 250 dias e também dos encontrados por JOST et al. (1972) indicando o seu aparecimento aos 200 dias.

Toda população de folículos que iniciou seu desenvolvimento (folículos primordiais contornados por células planas e cúbicas, folículos primários, em crescimento e antrais), será consumida por atresia e provavelmente por apoptose, ainda dentro do período fetal ou no início da fase neonatal.

O diâmetro médio das oogônias e dos seus respectivos núcleos apresentou correlação positiva e altamente significativa em todo o período estudado. Além disso, quando comparados, os diâmetros médios das oogônias e dos seus núcleos em diferentes períodos apresentaram diferenças significativas. Estes dados indicaram que essas células apresentaram um aumento contínuo de diâmetro até serem todas transformadas em oócitos ou serem consumidas por atresia e apoptose aos 140 dias após a fecundação, como afirmaram também MEDEIROS & YAMAMOTO (1998).

O diâmetro médio dos folículos primordiais, dos seus oócitos e dos respectivos núcleos também apresentou correlação positiva e altamente significativa entre si. Além de diferenças estatisticamente significativas ao se compararem seus diâmetros aos 100 dias com os diâmetros aos 140, 180 e 240 dias, respectivamente, embora ao se compararem os seus diâmetros aos 100, 210 e 240 dias as diferenças não fossem significativas pelo teste de Tukey. Isto indica que os folículos primordiais com seus oócitos e núcleos, tenderam a aumentar de diâmetro a partir do surgimento aos 100 dias após fecundação, reduzindo-se próximo ao final da gestação (\pm 240 dias), aproximando-se neste período a valores aos 100 dias. A provável causa dessa redução de diâmetro se deve ao fato de que aos 240 dias os folículos restantes, provavelmente serão aqueles em estágio dictióteno e que permanecem no ovário após o nascimento, compondo a população de folículos primordiais da fêmea até a puberdade, como sugerido por MEDEIROS & YAMAMOTO (1998). Os que apresentaram maior diâmetro (140, 180 dias após a fecundação respectivamente) atingiram fases mais adiantadas do desenvolvimento para então, serem consumidos durante a fase fetal ou logo após o nascimento.

Já o diâmetro médio dos folículos em crescimento mostrou correlação positiva e altamente significativa ($P < 0,01$) entre si, do seu oócito e respectivo núcleo, embora, não sofresse variações nos períodos estudados, já que não apresentou diferenças significativas ($p < 0,01$). Entretanto, os oócitos dos folículos em crescimento mostraram

diferenças significativas ($p < 0,05$), quando se compararam seus diâmetros aos 140 e 210 dias. Provavelmente, isso ocorreu porque estes folículos, contendo oócitos de 210 dias, já estariam em processo de atresia ou degeneração, enquanto os que estavam em períodos superiores aos 210 dias evoluiriam para folículos antrais ou entrariam em atresia somente após o nascimento. Estas observações coadunam-se com as encontradas por PETERS (1970), em várias espécies de mamíferos.

Finalmente, foi observado neste trabalho, a alta correlação positiva entre o diâmetro dos vários tipos de estruturas (oogônias e respectivos núcleos, folículos primordiais e folículos em crescimento, seus oócitos e respectivos núcleos). Mostrou também que o aumento do diâmetro da oogônia vem acompanhado do aumento do diâmetro do seu núcleo em todos os períodos estudados, o mesmo acontecendo com o desenvolvimento folicular que foi acompanhado pelo desenvolvimento do oócito e respectivo núcleo até atingir o estágio dictióteno ou ser consumido por atresia ou apoptose.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos levam a algumas indicações:

A formação gonádica em fetos da subespécie *Bos taurus indicus*, da raça Nelore ocorreu em períodos semelhantes aos da subespécie *Bos taurus taurus*, e a técnica histológica de rotina é suficiente para mostrar o início do desenvolvimento da crista gonádica a partir de 29 dias, e a identificação de CGP aos 34 dias após a fecundação.

Aos 40 dias a gônada já estava totalmente formada e podia ser diferenciada microscopicamente pela presença da albugínea em embriões do sexo masculino e a partir deste período, as oogônias que migravam para a gônada multiplicavam-se ativamente por mitose.

Folículos primordiais foram encontrados em fetos bovinos da raça Nelore a partir de 160mm de comprimento (± 95 dias) nas regiões mais profundas do córtex ovariano.

Folículos em crescimento foram encontrados em fetos bovinos da raça Nelore a partir de 350 mm (± 140 dias).

Folículos antrais apareceram inicialmente em fetos bovinos da raça Nelore, de aproximadamente 520 mm (± 180 dias).

Apesar de a oogênese ter o início e a duração semelhantes, a raça Nelore, diferentemente das raças taurinas, tem como característica a antecipação do surgimento da foliculogênese.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, T.G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. **Proceeding of the Royal Society of London, B**, London, n.158, p. 417-433, 1963.

BAKER, T.G. The sensitivity of oocytes in postnatal rhesus monkeys to X-irradiation. **Journal Reproduction Fertility**, London, v.12, p.183-193, 1966.

BEAUMONT, H.M.; MANDL, A.A. Quantitative study of oogonia and oocytes in the fetal and neonatal rat. **Proceeding of the Royal Society of London B**, London, v.155, p.557-579, 1962.

BLACK, J.L.; ERICKSON, B.H. Oogenesis and ovarian development in the pre-natal Pig. **Anatomical Record**, Filadelfia, v.161, número 4, p.45-55, 1968.

BRAMBEL, F.W.R. In: MARSHALL, S **Physiology of Reproduction**. London: Longmans Green and. Company, 1956, v.1, p.397 (ed. A.S. Parkes).

BYSKOV, A.G. Differentiation of mammalian embryonic gonads. **Physiological Review**, Bethesda, n.66, p.71-117, 1986.

BYSKOV, A.G. Primordial germ cells and regulation of meiosis In: AUSTIN, C.R. and SHORT, R.V. (eds). **Reproducing in mammals 1**. Germ Cells and Fertilization, 2 ed. London: Cambridge University, 1982. p.1-16.

BYSKOV, A.G.; HOYER, P.E. Embriology of mammalian gonads and ducts In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (eds). **The Physiology of Reproduction**, 2. ed. Raven , New York, 1994. p. 487-540.

CHALLONER, S. Studies of oogenesis and follicular development in the Golden Hamster. **Journal of Anatomy**, London, p.373-383, 1974.

DE FELICI, M. Discussion of Ginburg M: **Primordial germ cell formation in birds**. In: Germline development. Ciba Found Symposium. Amsterdam, 1994 v. 182, p.66.

DUVALL, E.; WYLLIE, A.H.; MORRIS, R.G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). **Immunology**, Oxford, v.56, p.351-358, 1985.

ECKERY, D. C.; TISDALL, D. J.; HEATH, D. A.; McNATTY, P. K. Morphology and function of the ovary during fetal and early neonatal life: a comparison between the sheep and brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n.1/4, p. 551-561,1996.

ERICKSON, B.H. Development and radioresponse of the prenatal bovine ovary. **Journal Reproduction Fertility**, London, v.10, p.97-105, 1966.

FRANCHI, L.L.; MANDL, A.M.; ZUCKERMAN, S. **Is the Ovary**. London: Chapter 1, ed. S.Zuckerman, A.M. MANDL S.P. ECKSTEIN. London Academic, Inc. 1962.

FUJIMOTO, T.; YUKIHIRO, M.; MASATOSHI, F. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. **The Anatomical Record**, Filadelfia, v.188, n.3, p.315-330, 1977.

FUJIMOTO, T.; YOSHINAGA, K., KONO I. Distributions of fibronectin and the migratory pathway of primordial germ cell in mice. **Anatomical Record**, Filadelfia, n. 211, p.271-278, 1985.

GINSBURG, M.; SNOW, M.H.L.; McLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, Cambridge, n. 110, p.521-528, 1990.

GODIN, I.; WRLIE, C.; HEASMAN, J. Genital ridges exert long range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. **Development**, Cambridge, n.108, p.357-361, 1990.

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

GROPP, A. ; OHNO, S. The presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle *Bos taurus*. **Zeitschrift Für Zellforschung**, Berlin, n.74, p.505-528, 1966.

HEATH, J.K. Mammals Germ Cells. In: JOHSON, M.H. **Development in Mammals**, Amsterdam, 1978, v.3 p.267-298, 1978.

JANTOSOVICOVA, J.; DANKS, J. JANTOSOVIC, J. A histological study of the follicular development in the pre natal ovary of the sheep. **Folia Veterinaria**, Milano, v.40, n.1/2, p.15-20, 1996.

JOST, A.; PRÉPIN, J. Données sur la migration des cellules germinales primordiales du foetus de veau. **Archives d'Anatomie Microscopique et Morphologie Expérimentale**, Paris, v.55, p.161-186, 1966.

JOST, A.; VIGIER, B.; PRÉPIN, P, PERCHELLET, J. P. Studies on Sex differentiation in mammals. **Journal Reproduction Fertility**, London, v.29, p.249-279. 1972

KARL, J., CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Development Biology**, Orlando, v. 203, p.323-333, 1998.

KIRKPATRICK, B. W.; MONSON, R.L. Sensitive Sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, n. 98, p. 335-340, 1993

MAKABE, S.; NOTTOLA, S.A.; MOTTA, P.M. Life history of the human female germ cell: Ultrastructural aspects. In: VAN BLECKOM, J. and MOTTA, P.m. (eds) Ultrastructure of human gametogenesis and early embryogenesis. **Kluwer Academic Publishers**, Boston, 1989, p.33-60.

MBASSA, G. K., Studies on the ovarian development in Zebu Cattle (*Bos indicus*). **Anatomy Histology and Embriology**, Berlin, n. 18 p.143-149, 1989.

MACKAY, S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 200, n. 53, p. 47-99, 2000.

McLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, n.163, p.3-9, 2000.

McLAREN, A. Development of primordial germ cells in the mouse, **Andrologia**, Berlin, v.24, p.243-247, 1992.

McLAREN, A. Development of the mammalian gonad: The fate of the supporting cell lineage. **Bioessays**, Cambridge, v.5, n.13, p.151-156, 1991.

McLAREN, A. **Germ cells and soma: A new look at an old problem**. New Haven: Yale University, 1981.

McLAREN, A. Primordial germ cells in mice. **Bibliotheca Anatomica**, Basel, v.24, p.59-66, 1983.

McNAMARA, N.; BLACK, V. Phagocytosis of degenerating germ cells in fetal guinea pig ovaries. **American Journal of Anatomy**, New York, n.142, p.485-498, 1975.

MASTSCHKE, G. H. & ERICKSON, B. H. Development and radioresponse of the prenatal bovine testis. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 1, n.2, p. 207-214, 1969.

MEDEIROS, S.F.; YAMAMOTO, M.M.W. Mecanismo do consumo folicular ovariano. **Reprodução e Climatério**, São Paulo, v.1, n.13, p. 18-27, 1998.

MICHALANY, J. **Tecnica histológica em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo: EPU., 1980, 277 p.

MINTZ, B. Continuity of the female germ cell line from embryo to adult. **Archives d'Anatomie Microscopique et Morphologie Expérimentale**. Paris, v. 48, p.155-172, 1959.

MOTTA, P.M.; MAKABE, S. Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three dimensional microanatomical study by scanning and transmission electrons microscopy. **Journal Submicroscopy Cytology and Pathology**, Bologna. v. 18, p.271-276, 1986.

MOTTA, P.M.; MAKABE, S.; WOTTOLA, S.A. The ultrastructure of human reproduction. In. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the development ovary. **Human Reproduction**. Oxford, n.3,. p.281-295, 1997.

MOUSTAFA, L.A.S., HAFEZ E.S.E. Prenatal development of the bovine reproductive sistem. **The Journal of Reproductive Medicine**, Saint Louis, v.7, n.3, p.99-113, sept. 1971.

NASCIMENTO, G.S. **Determinação do sexo de embriões bovinos pela técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction)**. Junho 1997 29 p. Monografia. (Trabalho de Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

NODEN, D.M.; DE LAHUNTA, A. **Embriologia de los Animales Domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1990.399p.

OHNO, S.; SMITH, J.B. Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. **Cytogenetics**, Basel, n.3, p.324-327, 1964.

ORTIZ, E. The embryological development of the wolffian and Müllerian ducts and the accessory reproductive organs of the golden hamster. **Anatomical Record**. Filadelfia, n.92, p.371-389, 1945.

PALMER, S.J. & BURGOYNE, P.S. In Situ Analysis of fetal, prepuberal and adult XX---XY Chimateric mouse testes; Sertoli Cells are predominantly, but not exclusively, XY. **Development**, Cambridge, v. 112, p.265-268, 1991.

PELLINIEMI, L.J. Ultraestruure of the indiferent gonad in male and female pig embryos. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v.8., n.1, p.163-174, 1976.

PESCE, M.; De FELICI, M. Apoptosis in mouse primordial germ cells. A study by transmission and scanning electron microscopy. **Anatomy and Embriology**, Berlin, v. 188, p.435-400, 1994.

PETERS, H. Migration of Gonocytes in to mamalian gonad and their differentiation. **Philosophical Transations Royal Society of London B**. London, v.259, p.91-101, 1970.

REXROAD, C.E.; CASIDA, L.E., TYLER, W.J. Crow-rump length of fetuses in purebred holstein-friesian cows. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 57, n.3, p. 346-347, marc. 1974.

SCHELHAS, H.F. Malignant Potential of the Dysgenetic Gonad. **Obstetrice and Gynecology**, New York, n.44, p.294-298, 1974.

SHIM, H.; ANDERSON, G.B. In Vitro Survival and Proliferation of Porcine Primordial Germ Cells . **Theriogenology**, New York, v.49, n.3, p. 521-528, 1998.

SHORT, R.V. Determination and differentiation In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Reproduction in Mammals: Embryonic and Fetal Development**, 2 ed., Cambridge: Cambridge University, 1982, p.70-113.

SKINNER, M.K.; TUNG, P.S.; FRITZ, I.B. Cooperativity Zetween Sertoli Cells and Testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 100, p.1941-1947, 1985.

STWARTZ, W. J. Effects of steroids on definite localization of primordial germ cells in the chick. **American Journal of Anatomy**, New York, n.142, p. 499-514, 1975.

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

WARTENBERG, H. Germ cell migration induced and guided by somatic cell interaction. **Bibliothec Anatômica**, Basel, n.24, p.93-110, 1983.

WILSON, J.D. Sexual differentiation. **Annual Review of Phisiology**, Palo Alto, v.40, p.279-306, 1978.

WROBEL, K.H.; SÜB, F. Identification an temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. **Anatomy and Embriology**, Berlin, n.197, p. 451-467, 1998.