

AVANÇOS NO ISOLAMENTO E SISTEMAS DE CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

[Advances in isolation and culture systems of preantral follicles]

Rafael Rossetto¹, Isadora Machado Teixeira Lima¹, Márcia Viviane Alves Saraiva¹, Isabel Bezerra Lima-Verde², Emmanuel Teles Sales¹, José Ricardo de Figueiredo¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, LAMOFOPA, Universidade Estadual do Ceará-UECE

²Instituto de Tecnologia e Pesquisa - ITP, Universidade Tiradentes-UNIT, Aracaju-SE

RESUMO - Os folículos pré-antrais presentes no córtex ovariano representam cerca de 95% de toda a população folicular e podem ser crescidos e maturados *in vitro*, visando a obtenção posterior de oócitos maduros e competentes, os quais poderão ser utilizados nas diversas biotécnicas da reprodução aplicadas aos animais domésticos. Os estudos relacionados com a foliculogênese podem ser feitos *in vivo*, através da análise de expressão de genes ou proteínas que estão presentes no ovário, e ainda *in vitro* com a utilização de diferentes sistemas, onde os folículos podem ser cultivados *in situ* ou isolados. Deste modo, neste trabalho foram abordados os diferentes métodos de isolamento e sistemas de cultivo *in vitro* empregados para a manutenção da integridade estrutural e desenvolvimento de folículos pré-antrais.

Palavras-Chave: Biotécnicas, desenvolvimento, foliculogênese.

ABSTRACT - The preantral follicles enclosed in ovarian cortex represent about 95% of the entire follicular population and can be grown and matured *in vitro* in order to obtain mature and competent oocytes, which may be used in various reproductive biotechnologies applied to domestic animals. Studies related to folliculogenesis can be performed *in vivo*, by analyzing the expression of genes or proteins that are present in the ovary, and also *in vitro* with the use of different systems, in which the follicles can be grown *in situ* or isolated. Thus, this study shows the different methods of isolation and *in vitro* systems employed for maintaining the structural integrity and development of preantral follicles.

Keywords: Biotechnology, development, folliculogenesis.

INTRODUÇÃO

Diversas tecnologias reprodutivas, tais como fertilização *in vitro*, transferência de embriões, transgênese e clonagem podem ser amplamente aplicadas às espécies domésticas. No entanto, para a sua execução é necessária uma grande quantidade de oócitos competentes capazes de produzir embriões e, conseqüentemente, crias viáveis. Tais oócitos poderiam ser recuperados a partir de folículos pré-antrais presentes no córtex ovariano, os quais representam cerca de 95% de toda a população folicular e podem ser crescidos e maturados *in vitro* a fim de promover a produção de oócitos maduros e competentes (Figueiredo et al., 2007). De fato, estudos em diferentes espécies têm demonstrado a recuperação um número significativo

de oócitos a partir de folículos pré-antrais (bovinos: Gutierrez et al., 2000; ovinos: Arunakumari et al., 2007; caprinos: Silva et al., 2010; bubalinos: Gupta et al., 2008).

O sucesso do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais depende do emprego de métodos eficazes que permitam seu adequado isolamento, evitando danos estruturais e garantindo a sobrevivência folicular. Além disso, para que estes folículos se desenvolvam *in vitro* é de extrema importância a utilização de sistemas de cultivo capazes de manter a sobrevivência e suportar o crescimento dos oócitos inclusos nos folículos pré-antrais até sua completa maturação. Aliando corretamente estas duas etapas, torna-se possível potencializar a reprodução assistida de animais geneticamente superiores

através do fornecimento de milhares de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, bem como para as demais biotécnicas reprodutivas.

Deste modo, buscamos enfatizar nesta revisão as bases gerais da foliculogênese *in vivo*, bem como os diferentes métodos de isolamento folicular e sistemas de cultivo *in vitro* empregados para a manutenção da integridade estrutural e desenvolvimento de folículos pré-antrais.

FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a gênese do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (Van Den Hurk e Zhao, 2005). Este processo inicia-se durante a vida fetal na maioria das espécies, como primatas e ruminantes (Knight e Glister, 2006), podendo também ocorrer logo após o nascimento em roedores (Ojeda et al., 2000). Os folículos primordiais representam a grande maioria (95%) da população folicular presente no ovário, constituindo o *pool* de reserva de folículos quiescentes. Estes folículos, após serem ativados, ou seja, saírem da fase de quiescência, passam por um programa sequencial de crescimento regulado pela ação de hormônios e ainda por fatores de crescimento. Uma vez iniciada, a foliculogênese visa assegurar a liberação de um oócito maturo, apto à fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (Hickey et al., 2005).

O folículo ovariano é composto por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e

tecais). Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito cresce e as células da granulosa (CG) circundantes se multiplicam e se diferenciam (Bristol-Gould e Woodruff, 2006), adquirindo capacidade esteroidogênica (Hickey et al, 2005). O crescimento folicular ocorre continuamente durante a vida ou pelo menos até ocorrer a exaustão da reserva de folículos primordiais. Quando um determinado folículo deixa a reserva, irá crescer até a ovulação ou entrar em atresia ou morte folicular, sendo este processo responsável pela eliminação de aproximadamente 99,9% dos folículos presentes no ovário (Mayer et al., 2004).

CARACTERÍSTICAS DOS FOLÍCULOS OVARIANOS

Os folículos ovarianos podem ser classificados, de acordo com o grau de evolução, em pré-antrais - FOPA (primordiais, primários e secundários) ou antrais (terciários e pré-ovulatórios) (Figueiredo et al., 2008) (Figura 1). Os folículos primordiais são constituídos por um oócito esférico ou oval, circundado por células da pré-granulosa de formato pavimentoso. O núcleo do oócito é relativamente grande e ocupa uma posição central ou excêntrica, podendo ter o nucléolo evidente. A zona pelúcida neste estágio ainda não é totalmente observada, verificando-se uma justaposição do oócito e das células da granulosa, sem nenhuma junção específica (Lucci et al., 2001). Após a ativação, os folículos desta classe dão origem ao grupo de folículos em crescimento (primários, secundários e terciários) (Van Den Hurk e Zhao, 2005, Pepe et al., 2006).

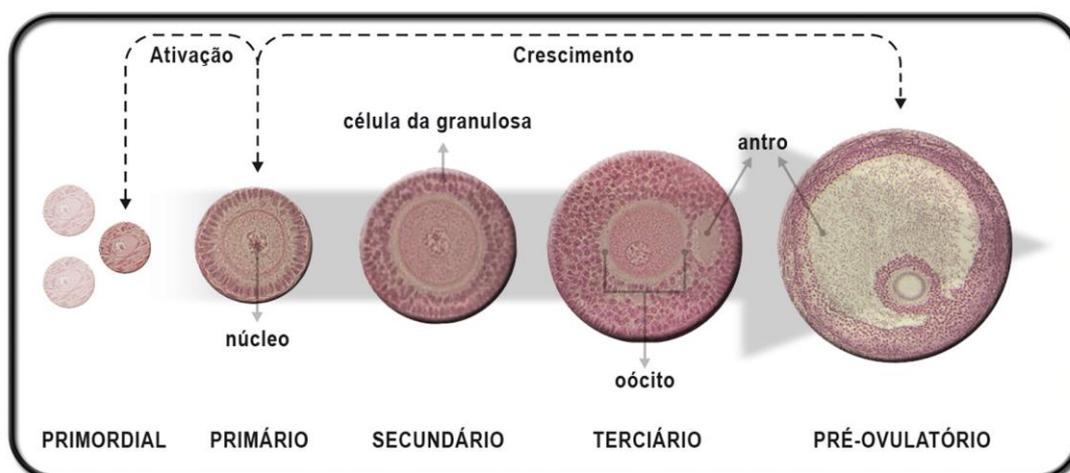


Figura 1. Etapas do processo de ativação e desenvolvimento folicular.

Os folículos primários são formados por um oócito circundado por células da granulosa de formato cubóide, dispostas em uma única camada. A partir desse estágio, o oócito passa a manter um estreito contato com as células da granulosa através de endocitose. A membrana plasmática do oócito apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes e algumas microvilosidades aparecem na superfície oocitária (Lucci et al., 2001).

Após intensa multiplicação das células da granulosa, uma nova camada de células é formada, dando origem ao grupo de folículos chamados secundários. Estes folículos são constituídos por um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia. Com o desenvolvimento dos folículos, o espessamento da zona pelúcida torna-a visível (Lucci et al., 2001), ocorre a formação das células da teca a partir do estroma intersticial (Honda et al., 2007) e também o aumento do número de microvilos, os quais passam a facilitar a captação de nutrientes e a excreção de metabólitos, demonstrando-se essenciais para a sobrevivência oocitária.

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do tamanho folicular. O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pela continuidade da fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (Van Den Hurk e Zhao, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como para a manutenção da fertilidade (Drummond, 2006).

MÉTODOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA FOLICULOGÊNESE

1. Estudo da foliculogenese *in vivo*

O estudo do desenvolvimento folicular *in vivo* pode ser realizado através da análise de expressão de

genes ou proteínas que estão presentes no ovário, utilizando-se, para isso, diferentes técnicas como PCR, imunohistoquímica, Southern e Northern blot. Tais técnicas podem indicar com precisão a existência de uma determinada substância ou de seu receptor no ovário e nos diferentes compartimentos foliculares. Além disso, a mutagênese, que utiliza modelos de camundongas com alterações em genes específicos que codificam determinados hormônios, fatores de crescimento e seus receptores, possibilita o estudo da ausência ou super expressão de tais substâncias no ovário ou sistema reprodutor (Barnett et al., 2006). Atualmente, o modelo de camundongas transgênicas é considerado a forma mais eficiente de estudo da regulação do crescimento folicular. Em adição, métodos de ultrassonografia permitem o acompanhamento do desenvolvimento folicular avançado (folículos antrais), após a utilização sistêmica de determinadas substâncias (Campbell et al., 2004).

2. Estudo da foliculogenese *in vitro*

Para o estudo do desenvolvimento folicular *in vitro*, diferentes sistemas de cultivo vêm sendo realizados para o teste de diferentes substâncias, visando a manutenção da viabilidade folicular, bem como o estímulo ao crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* (Fortune, 2003). Dentre os métodos de cultivo comumente utilizados, podemos destacar o cultivo do ovário inteiro, de fragmentos do córtex ovariano e de folículos isolados, sendo este último realizado nas formas bi ou tridimensional.

Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos. O'Brien et al. (2003) tiveram grande sucesso com a ativação de folículos primordiais *in vitro* utilizando ovários inteiros de camundongas, sendo obtido o nascimento de 59 crias viáveis. Em virtude dos excelentes resultados, o cultivo de ovários inteiros tem sido bastante adotado por diferentes grupos de pesquisadores que utilizam como modelo animais de pequeno porte (Nilsson e Skinner, 2004; Jin et al., 2010).

Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, o cultivo do ovário inteiro torna-se inviável. Nestes animais, o cultivo de pequenos fragmentos do córtex ovariano (cultivo *in situ*) tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos pré-antrais caprinos (Rossetto et al., 2009), bovinos (Braw-Tal e Yossefi, 1997), babuínos

(Wandji et al., 1997) e humanos (Zhang et al., 2004). Além da praticidade, o cultivo *in situ* tem a vantagem de manter o contato entre os folículos e as células do estroma ovariano (Abir et al., 2006), além de manter a integridade tridimensional folicular. No entanto, neste modelo, embora haja uma expressiva ativação folicular, poucos folículos primários cultivados progridem até o estágio de folículo secundário (Fortune, 2003).

Além do cultivo de folículos *in situ*, pode-se realizar ainda o cultivo de folículos isolados a partir do tecido ovariano. Uma vez realizado o isolamento (mecânico e/ou enzimático), os folículos podem ser cultivados preservando sua morfologia para o estudo dos efeitos *in vitro* de diferentes substâncias, como hormônios e fatores de crescimento (Silva, 2005). O método de cultivo folicular na forma isolada possibilita o acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de permitir uma maior perfusão do meio para o folículo (Abir et al., 2006). Além disso, segundo Smitz e Cortvrindt (2002), o cultivo de folículos isolados permite um estudo comparativo das melhores condições de cultivo, uma vez que é possível comparar grupos com um mesmo número de folículos em um determinado estágio de desenvolvimento (Lass et al., 1997; Qu et al., 2000).

Para folículos isolados, o cultivo pode ser realizado utilizando dois diferentes sistemas, bi e tridimensional, classificados de acordo com o tipo de contato do folículo com o substrato. No sistema bidimensional, o folículo encontra-se sobre o substrato, o qual pode ser o próprio plástico da placa de cultivo, recoberto ou não por ágar, por componentes da matriz extracelular purificados (colágeno do tipo I, fibronectina, laminina e matrigel) ou mesmo por monocamada de células somáticas (células da granulosa, fibroblastos e demais componentes do estroma ovariano) (Figueiredo et al., 2008). Contudo, folículos cultivados nesse tipo de sistema são capazes de aderir à superfície de cultivo, ocasionando a migração de células somáticas a partir do oócito. Tal fenômeno resulta, por sua vez, na alteração da estrutura tridimensional do folículo, interrompendo as interações células somáticas-gameta, necessárias para o crescimento normal do oócito (West et al., 2007). Em virtude deste entrave, tem-se optado comumente pelo sistema de cultivo tridimensional, que mimetiza a arquitetura interna do ovário, demonstrando-se eficaz para suportar o adequado crescimento folicular e maturação oocitária (Jin et al., 2010).

No sistema tridimensional, o folículo encontra-se no interior do substrato, sendo totalmente circundado por ele. O cultivo folicular tridimensional com matriz extracelular é utilizado na tentativa de se preservar o formato esférico tridimensional dos folículos, evitando o afastamento das células da granulosa do oócito (Nayudu e Osborn, 1992). Alguns estudos mostraram que o co-cultivo com células da granulosa utilizando gel de colágeno em sistema tridimensional foi capaz de suportar o crescimento folicular de ratos (Torrance et al., 1989), humanos (Abir et al., 1999) suínos (Hirao et al., 1994), murinos (Oktem e Oktay, 2007) e bovinos (Alm et al., 2006), além de possibilitar a manutenção da estrutura tridimensional do folículo até a fase antral.

Tendo em vista as vantagens proporcionadas pela utilização do sistema de cultivo de folículos isolados no estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento folicular, esforços têm sido concentrados no aperfeiçoamento de técnicas para a recuperação de folículos íntegros do ambiente ovariano.

MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAI

Métodos mecânicos e/ou enzimáticos vêm sendo utilizados com sucesso para o isolamento de folículos pré-antrais. Os primeiros registros de estudos com folículos pré-antrais isolados em animais de laboratório (camundongos: Grob, 1964) e animais domésticos (bovinos: Figueiredo et al., 1993) ocorreram nas décadas de 60 e 90, respectivamente, utilizando-se ambos os procedimentos. O princípio das técnicas de isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina, etc.) utilizando-se, para tanto, instrumentos mecânicos associados ou não aos químicos ou enzimáticos.

O tratamento enzimático baseia-se na utilização de enzimas digestivas, como a colagenase, tripsina, pronase e DNase, que digerem o estroma e permitem o isolamento de um grande número de pequenos folículos. Embora este método otimize a taxa de recuperação de folículos isolados, as células da teca e a membrana basal podem ser danificadas durante o processo, comprometendo a estrutura e, conseqüentemente, o crescimento do folículo *in vitro*. Demeestere et al. (2000) verificaram que

100% dos folículos isolados enzimaticamente romperam a membrana basal após o cultivo *in vitro* por dois dias, contrastando com apenas 35,9% de ruptura nos folículos inicialmente submetidos ao procedimento de isolamento mecânico. O problema constatado após o isolamento enzimático pode ser minimizado através do cultivo em matriz de colágeno ou ágar, os quais têm demonstrado um grande potencial para manter a arquitetura folicular e permitir a adesão entre as células (Torrance et al., 1989; Roy e Treacy, 1993; Hirao et al., 1994). Segundo Roy e Treacy (1993), géis de ágar auxiliam nas fases iniciais de formação de antro para folículos pré-antrais humanos cultivados por 5 dias. Ainda com relação ao isolamento enzimático, em hamsters, a colagenase foi utilizada com sucesso para isolar folículos pré-antrais (Roy e Greenwald, 1985). Já outras enzimas, tais como a pronase e a tripsina, foram utilizadas para isolar folículos pré-antrais de camundongas (Grob, 1969) e porcas (Morbeck et al., 1993), promovendo a recuperação de um número elevado de folículos a partir dos ovários. Contudo, em algumas espécies domésticas, enzimas digestivas como a DNase e a colagenase foram consideradas ineficientes para isolar folículos pré-antrais intactos, devido à natureza fibrosa dos ovários (Itoh e Hoshi, 2000).

Para os procedimentos mecânicos de isolamento folicular, utiliza-se comumente o tissue chopper, mixers, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes (Figura 2). Tais procedimentos têm a desvantagem de recuperar um número reduzido de folículos em comparação ao isolamento enzimático, porém permitem a manutenção da integridade da membrana basal e da camada de células da teca. A teca é importante na manutenção da conformação esférica do folículo, possibilitando o seu desenvolvimento *in vitro* na ausência de uma matriz extracelular, bem como a formação de antro (Qvist et al., 1990; Gosden et al., 1993).

Atualmente, os métodos mecânicos vêm sendo amplamente utilizados para isolar folículos pré-antrais de várias espécies. A microdissecção (método que utiliza agulhas dissecantes) tem se tornado uma das técnicas mais adotadas para o isolamento de folículos pré-antrais secundários em camundongas (Cortvrindt et al. 1996), ratas (Daniel et al., 1989), gatas (Jewgenow, 1996), ovelhas (Tamilmani et al., 2005), vacas (Gutierrez et al., 2000), búfalas (Santos et al., 2006; Silva et al., *in press*), cabras (Saraiva et al., 2010) e mulheres (Abir et al., 1999), permitindo o adequado isolamento folicular. Esta técnica tem a vantagem de permitir a manutenção da estrutura folicular e membrana basal, além de preservar os receptores de superfície e a interação entre os compartimentos foliculares (teca-granulosa-oócito) após o isolamento (Kurvila, 2007).

Além da microdissecção, as demais técnicas de isolamento mecânico citadas também têm proporcionado a obtenção de um grande número de folículos pré-antrais (Tabela 1).

Segundo Sharma et al. (2009), as diferenças nas taxas de recuperação folicular observadas nos diversos tipos de isolamento podem ser explicadas devido à diferença na composição dos ovários (fibras e células) entre as espécies e ainda à variação na classificação folicular.

No que diz respeito aos métodos de recuperação ou separação folicular empregados após o isolamento, podemos citar o método de elutriação por centrifuga, o qual consiste em um processo de separação de partículas minúsculas por decantação potencializada pela centrifuga, frequentemente utilizado para a separação de folículos a partir de células somáticas (Greenwald e Moor, 1989; Lazzari et al., 1992). Já o método de filtragem, que consiste na remoção de células do estroma e demais

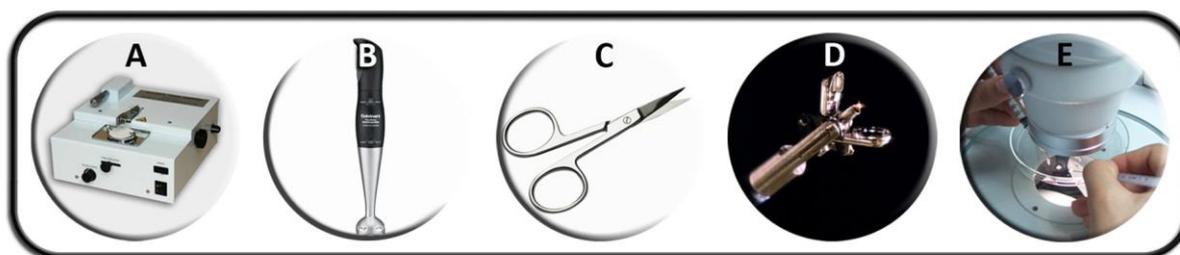


Figura 2. Principais equipamentos utilizados no isolamento mecânico de folículos pré-antrais. A: Tissue chopper; B: Mixer; C: Tesoura cirúrgica; D: Fórceps; E: Agulhas dissecantes.

Tabela 1. Quantidade de FOPAS isolados por ovário em diferentes métodos de isolamento e espécies.

PESQUISADORES	ESPÉCIE	MÉTODO DE ISOLAMENTO	Nº. de FOPAS
Figueiredo et al., 1993	Bovina	Tissue chopper	2.142
Nuttinck et al., 1993	Bovina	Mixer	90
Hulshof et al., 1994	Bovina	Fórceps	2.918
Bem et al., 1997	Bovina	Tissue chopper	70.075
Amorim et al., 1996	Ovina	Tissue chopper	531
Lucci et al., 1999	Caprina	Tissue chopper	9.664
Jewgenow e Pitra, 1993	Caprina	Agulhas dissecantes	30
Jewgenow e Pitra, 1991	Felina	Raspadores de ovário	335

tipos celulares utilizando filtros específicos, não exige grandes quantidades de tecido ovariano para a separação das células foliculares, sendo amplamente utilizado em diferentes espécies, tais como bovinos (Carambula et al., 1999), ovinos (Amorim et al., 2003) e animais silvestres (Jewgenow e Stolte, 1996). No entanto, este método tem ocasionado extensa perda folicular, com folículos permanecendo presos ao filtro após a lavagem.

Assim, para superar este problema, foi desenvolvida a técnica de Ficoll, que permite a separação e recuperação de um grande número de folículos pré-antrais por gradiente de densidade. Tal procedimento consiste na utilização de um tubo cônico adicionado de camadas descontínuas de gradiente de Ficoll, apresentando em sua camada mais superficial um sobrenadante contendo folículos. Através da centrifugação a uma velocidade de 50xg por 17 minutos, é possível obter um sedimento com a presença de folículos derivados da separação ocasionada pela diferença de densidade entre as células do estroma e os folículos (Martinez-Madrid et al., 2004).

AVANÇOS NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

Ao longo das últimas décadas, um notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies (Figura 3). Em felinos (Jewgenow et al., 1998), marsupiais (Butcher e Ullman, 1996) e babuínos (FORTUNE et al., 1998) foi verificado significativo crescimento de folículos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*,

porém sem a formação de antro. Nas espécies humana (Telfer et al., 2008), bovina (McLaughlin et al., 2010) e canina (Serafim et al., 2010), grandes folículos secundários isolados foram cultivados *in vitro* por diferentes períodos e se desenvolveram até a fase antral. Já em suínos (Wu et al., 2001), bubalinos (Gupta et al., 2008), caprinos (Saraiva et al., 2010) e ovinos (Aranakumari et al., *in press*), oócitos oriundos de folículos secundários crescidos *in vitro* sofreram maturação, resultando na produção de embriões após fertilização *in vitro*. Entretanto, as taxas de maturação de oócitos a partir de FOPA crescidos *in vitro* é ainda muito baixa.

Embora importantes conquistas tenham sido obtidas com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais nas referidas espécies (Figura 3), os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. Carroll et al. (1990) obtiveram o nascimento de camundongos após o desenvolvimento *in vitro* de folículos primários, previamente submetidos à congelamento e descongelamento. Nesta mesma espécie, o cultivo de folículos primordiais também resultou no nascimento de um camundongo após crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos inclusos nos folículos cultivados (Eppig e O'Brien, 1996). Já no início da década atual, O'Brien et al. (2003), utilizando um sistema de cultivo em dois passos (cultivo de ovário inteiro seguido de cultivo de folículos secundários isolados) relataram ainda a produção de embriões e o nascimento de camundongos viáveis (59 crias) a partir oócitos de folículos primordiais cultivados *in vitro*, o que representou o maior avanço obtido até a atualidade utilizando folículos pré-antrais recuperados do ambiente ovariano.

ESPÉCIE	ISOLAMENTO	CULTIVO	Cresc.	Antro	Matur.	Embrião	Nasc.
GATA Jewgenow <i>et al.</i> , 1998							
CADELA Serafim <i>et al.</i> , 2010							
VACA McLaughlin <i>et al.</i> , 2010							
MULHER Telfer <i>et al.</i> , 2008		1) 2)					
OVELHA Arunakumari <i>et al.</i> , 2010							
CABRA Saraiva <i>et al.</i> , 2010							
PORCA Wu <i>et al.</i> , 2001							
BÚFALA Gupta <i>et al.</i> , 2008		 					
CAMUNDONGA O'Brien <i>et al.</i> , 2003							

Figura 3. Quadro ilustrativo dos principais avanços obtidos com o cultivo *in vitro* de folicúlos pré-antrais em diferentes espécies nos últimos 12 anos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Conforme mostrado, o cultivo *in vitro* de folicúlos pré-antrais tem contribuído para a compreensão da foliculogênese em diferentes espécies. A obtenção de embriões a partir do cultivo *in vitro* de folicúlos pré-antrais avançados (folicúlos secundários) em animais domésticos, como caprinos, suínos e bubalinos tem gerado novas perspectivas para a produção em larga escala de embriões. O contínuo aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo e das técnicas de isolamento folicular possibilitará, em um futuro bem próximo, a utilização de um grande número de oócitos oriundos de folicúlos pré-antrais em estádios precoces de desenvolvimento crescidos *in vitro* em programas de reprodução assistida, contribuindo para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou mesmo em vias de extinção.

REFERÊNCIAS

- Abir R., Nitke S., Ben-Haroush A. & Fisch B. et al. 2006. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol. Histopathol.* 21:887-898.
- Abir R., Roizman P. & Fisch B. et al. 1999. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum. Reprod.* 14:1299-1301.
- Alm H., Katska-Ksiazkiewicz L. & Ryńska B. et al. 2006. Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early

antral ovarian follicles. *Theriogenology.* 65:1422-1434.

Amorim C., Rondina D. & Rodrigues A.P.R. et al. 2003. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. *Theriogenology.* 60:735-42.

Amorim C.A., Rodrigues A.P.R. & Lucci C.M. et al. 1996. Desenvolvimento e otimização de um método mecânico para o isolamento de folicúlos ovarianos pré-antrais ovinos: resultados preliminares. II Encontro de Pesquisadores da UECE, Fortaleza, 8-10 de novembro, p.471.

Arunakumari G., Shanmugasundaram N. & Rao V.H. et al. 2010. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology.* 74(5):884-94.

Arunakumari G., Vagdevi R. & Rao B.S. et al. 2007. Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep preantral follicles. *Small Rum. Res.* 70:93-100.

Barnett K.R., Schilling C.C.R. & Greenfeld C.R. et al. 2006. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum. Reprod.* 10:1-19.

Bem A.R., Lucci C.M. & Rodrigues A.P.R. et al. 1997. Isolamento mecânico de folicúlos pré-antrais de vacas Nelore. In: *Arq. Fac. Vet.* 25:82.

Braw-Tal, R. & Yossefi, S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth on the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 109:165-171.

Bristol-Gould S. & Woodruff T.K. 2006. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology.* 66:5-13.

Butcher L. & Uimarm S.L. 1996. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:535-539.

Campbell B., Telfer E.E. & Webb R. et al. 2004. Evidence of a Role for Follicle-Stimulating Hormone in Controlling the Rate of Preantral Follicle Development in Sheep. *Endocrinology.* 145:1870-1879.

- Carambula S.F., Goncalves P.B.D. & Costa L.F.S. et al. 1999. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. *Theriogenology*. 52:563-71.
- Carroll J., Whittingham D.G., Wood, M.J. et al. 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod. Fertil.* 90:321-327.
- Cortvrindt R., Smitz J. & Van Steirteghem A. et al. 1996. In vitro maturation, fertilisation and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum. Reprod.* 11:2656-2666.
- Daniel S.A.J., Armstrong D.T. & Gore-Langton R.E. et al. 1989. Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Res.* 24:109-121.
- Demeestere I., Delbaere A. & Gervy C. et al. 2000. Effect of preantral follicle isolation technique on follicular growth, oocyte maturation and fertilization in vitro in the mouse. *Hum. Reprod.* 15:(Abst. book 1), p.89-90.
- Drummond A.E. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. Endo.* 4:1-11.
- Eppig J.J. & O'Brien M.J. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 54:197-207.
- Figueiredo J.R., Hulshof S.C. J. & Nussgens B. et al. 1993. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. 2-Effects of pyruvate, glutamine and hypoxanthine. 9^{ème} Reunion AETE, Lyon, p.198.
- Figueiredo J.R. 2007. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*. 15:173-182.
- Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R. & Amorim C.A. et al. 2008. Manipulação de óocitos inclusos em foliculos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Goncalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Editora Roca, p.303-327.
- Fortune J.E., Kito S. & Wandji S.A. et al. 1998. Activation of bovine in baboon primordial follicular in vitro. *Theriogenology*. 49:441-449.
- Fortune J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 7:135-163.
- Gosden R.G., Boland N.I. & Spears N. et al. 1993. The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. *Reprod. Med. Rev.* 2:129-152.
- Greenwald G.S. & Moor R.M. 1989. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J. Reprod. Fertil.* 87:561-71.
- Grob H.S. 1964. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. *Science*. 146:73-74.
- Grob H.S. 1969. Growth and endocrine function of isolated ovarian follicles cultured in vivo. *Biol. Reprod.* 1:320-323.
- Gupta P.S.P., Ramesh H.S. & Manjunatha B.M. et al. 2008. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. *Zygote*. 16:57-63.
- Gutierrez C.G., Ralph J.H. & Telfer E.E. et al. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.* 62:1322-1328.
- Hickey T.E., Marrocco D.L. & Amato F. et al. 2005. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 73:825-832.
- Hirao Y., Nagai T. & Kubo M. et al. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 100:333-339.
- Honda A., Hirose M. & Hara K. et al. 2007. Isolation, characterization and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:12389-12394.
- Hulshof S.C.J., Figueiredo J.R. & Beckers J.B. et al. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Quarterly Journal of Veterinary Science*, 16:78-80.
- Itoh T. & Hoshi H. 2000. Efficient isolation and long-term viability of bovine small preantral follicles in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 36:235-240.
- Jewgenow K. & Pitra C.A. 1991. Method for isolation of preantral follicles from cattles ovaries. *Reprod. Dom. Anim.* 26:281.289.
- Jewgenow K. & Pitra C. 1993. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*. 39:527-535.
- Jewgenow K., Penfold L.M. & Meyer H.H.D. et al. 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 112:39-47.
- Jewgenow K. & Stolte M. 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats-viability and ultrastructural investigations. *Anim. Reprod. Sci.* 44:183-193.
- Jin S.Y., Lei L. & Shikanov A. et al. 2010. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil. Steril.* v.93(8):2633-9.
- Knight P.G. & Glistler C. 2001 Potential regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*. 121:503-512.
- Kurvila A. 2007. Cloning and sequencing of FSH receptor gene from buffalo preantral follicles. M.V.Sc. thesis submitted to division of physiology and climatology, Deemed University, IVRI, Izatnagar.
- Lass A., Silye R. & Abrams D.C. et al. 1997. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess the ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 12:1028-1031.
- Lazzari G., Galli C. & Moor R.M. et al. 1992. Centrifugal elutriation of porcine oocytes isolated from the ovaries of newborn piglets. *Anal. Biochem.* 200:31-35.
- Lucci C.M., Silva R.V. & Carvalho C.A. et al. 2001. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rum. Res.* 41:61-69.
- Lucci C.M., Amorim C.A. & Bão S.N. et al. 1999. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 56:39-49.
- Martinez-Madrid B., Dolmans M. & Langendonck A. et al. 2004. Ficoll density gradient method for recovery of isolated human ovarian primordial follicles. *Fertil. Steril.* 82:1648-1653.
- Mayer L.P., Devine P.J. & Dyer C.A. et al. 2004. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biol. Reprod.* 71:130-138.

- Mclaughlin M., Bromfield J.J. & Albertini D.F. et al. 2010. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Mol. Hum. Reprod.* 16(9):644-653.
- Morbeck D.E., Flowers W.L. & Britt J.H. et al. 1993. Response of granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 99:577-584.
- Nayudu P.L. & Osborn S.M. 1992. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 95:349-362.
- Nilsson E.E., Skinner, M.K. 2004. Kit Ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell. Endoc.* 214:19-25.
- Nuttinck F., Mermillod P. & Massip A. et al. 1993. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology.* 39:811-821.
- O'Brien M.J., Pendola J.K. & Eppig J.J. et al. 2003. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol. Reprod.* 68:1682-1686.
- Ojeda S.R., Romero C. & Tapia V. et al. 2000. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 163:67-71.
- Oktem O. & Oktay K. 2007. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer*, v.110, p.2222-2229.
- Pepe G.J., Billiar R.B. & Albrecht E.D. et al. 2006. Regulation of baboon fetal ovarian folliculogenesis by estrogen. *Mol. Cell. Endo.* 247:41-46.
- Qu J., Godin P.A., Nisolle M. et al. 2000. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.* 15:302-310.
- Qvist R., Blackwell L.F., Bourne H., et al. 1990. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 89:169-180.
- Rossetto R., Lima-Verde I.B. & Matos M.H.T. et al. 2009. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. *Dom. Anim. Endo.* v.37, p.112-123.
- Roy S.K. & Greenwald G.S. 1985. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: Histological and quantitative aspects. *Biol. Reprod.* 32:203-215.
- Roy S.K. & Treacy B.J. 1993. Isolation and long term culture of human preantral follicles. *Fertil. Steril.* 59:783-790.
- Santos S.S.D., Biondi F.C., Cordeiro M.S. et al. 2006. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. *Anim. Reprod. Sci.* 95:1-15.
- Saraiva M.V.A., Rossetto R. & Brito I.R. et al. 2010. Dynamic medium containing FSH, LH and EGF produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38(supl.2):712.
- Serafim M.K.B., Araújo V.R. & Silva G.M. et al. 2010. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology.* 74:749-755.
- Sharma G.T., Dubey P.K. & Meur S.K. et al. 2009. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. *Livestock Science.* 123:300-305.
- Silva C.M.G., Matos M.H.T. & Rodrigues G.Q. et al. 2010. In vitro survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Anim. Reprod. Sci.* 117:83-89.
- Silva, J.R.V. Growth factors in gona ovarios and the role of ativina-A in the development of esrly-staged follicles. 142f. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, 2005.
- Smitz J.E.J. & Cortvrindt, R.G. 2002. The earliest stages of folliculogenesis invitro. *Reproduction.* 123:185-202.
- Tamilmani G., Rao, B.S. & Vagdevi, R. et al. 2005. Nuclear maturation of ovine oocytes from sheep preantral follicles cultured in vitro. *Small Rum. Res.* 60:295-305.
- Telfer E.E., Mclaughlin M. & Ding C. et al. 2008. A two step serum free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* 23:1151-1158.
- Torrance C., Telfer E. & Gosden R.G. et al. 1989. Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. *J. Reprod. Fertil.* 87:367-374.
- Van Den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocyte and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 63:1717-1751.
- Wandji S.A., Srsen V. & Nathanielsz P.W. et al. 1997. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Hum. Reprod.* 12:1993-2001.
- West E.R., Xu M. & Woodruff T.K. et al. 2007. et al. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials*, v.28, p.4439-4448.
- Wu J., Emery B.R., Carrel D.T. et al. 2001. In vitro growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes. *Biol. Reprod.* 64(1):375-381.
- Zhang P., Louhio H. & Tuuri, T. et al. 2004. In vitro effect of cyclic adenosine 30,50-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. *J. Ass. Reprod. Genet.* 21:310-306.