

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO
DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE SUÍNOS

Bênner Geraldo Alves
Médico Veterinário

Uberlândia – Minas Gerais - Brasil
Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO
DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE SUÍNOS**

Bênner Geraldo Alves

Orientador: Prof. Dr. José Octavio Jacomini

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal
Linha de Pesquisa: Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva

Uberlândia – Minas Gerais - Brasil
Fevereiro de 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A474 i Alves, Bênnner Geraldo, 1975-
Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de
suínos [manuscrito] / Bênnner Geraldo Alves. - 2010.

52 f. : il.

Orientador:..José Octavio Jacomini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal - Teses. 2. Suíno - Ovário - Teses. I. Jacomini, José Octavio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 636.082.4

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Produção Animal –
Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia**

Dissertação defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2010, pela comissão
examinadora constituída por:

Prof. Dr. José Octavio Jacomini

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

*“Cada um de nós compõe a sua própria história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz”*
*“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei”*

Trechos da música “Tocando em Frente”

Almir Sater e Renato Teixeira

DEDICATÓRIA

À minha esposa (Kele) pelo amor e apoio incondicional.

A razão do meu viver, meus filhos Gabriel e Giovanna.

Aos meus pais, Vera e Klínger, sempre presentes nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos e amigos eternos Braynner e Henner.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade, saúde, paz, amor e fé para enfrentar os obstáculos e vencer mais esta etapa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Octavio Jacomini, que possui as virtudes da paciência, sabedoria e humildade, o que transforma as dificuldades do dia a dia em pequenos obstáculos. Obrigado pela disponibilidade irrestrita, pela confiança, por sua amizade e exemplo de dignidade e integridade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, pelos ensinamentos dedicados durante este período, pela amizade, sabedoria, apoio e sugestões que contribuíram para aprimorar meu trabalho. Um exemplo de pesquisador a ser seguido.

Aos professores do laboratório de reprodução animal, Dra. Ricarda Maria dos Santos e Dra. Teresinha Inês de Assumpção, pela amizade e convívio agradável.

Ao Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes, por aceitar e gentilmente participar da banca da defesa desta dissertação.

Aos técnicos do laboratório de histologia Rui, Marcelo, Fabrício e Mariane, pela amizade e apoio técnico prestados ao desenvolvimento deste trabalho, sem o qual seria impossível realizá-lo. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas graduandos, mestrandos e doutorandos Daniel, Guilherme, Ivanmário, Marília, Carina, Jacqueline, Rodrigo, Frederico, Aline, Mário, Nádia, Cláudio, Rosiane, João Helder, Saira, Letícia e Susana, pela amizade, ensinamentos e bons momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo e à equipe do LAMOFOPA da Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade de estágio e ensinamentos dedicados, importantes para a realização deste trabalho.

Ao Frigorífico Real e às colegas de mestrado Claudesina e Serli, pelo apoio e fornecimento de material necessários para a pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Ciências Veterinárias.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO	13
2.REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Ovário de mamíferos.....	15
2.2 Ovogênese.....	15
2.3 Foliculogênese.....	16
2.3.1 Folículos primordiais.....	17
2.3.2 Folículos primários.....	17
2.3.3 Folículos secundários.....	18
2.3.4 Folículos terciários.....	18
2.4 Ativação folicular.....	19
2.5 Aplicações da biotécnica da MOIFOPA.....	20
3.MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Local.....	23
3.2 Animais.....	23
3.3 Coleta do material e procedimentos.....	23
3.4 Morfometria ovariana, isolamento mecânico folicular e quantificação de FOPA.....	23
3.5 Análise qualitativa de FOPA isolados pelo procedimento mecânico...	26
3.6 Processamento histológico, morfometria e quantificação folicular.....	26
3.7 Análise estatística.....	28
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

LISTA DE ABREVIACOES

BMP-15	Proteína morfogenética do osso-15
CGP	Células germinativas primordiais
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FOPA	Folículo pré-antral
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação-9
g	Gramas
HE	Hematoxilina-eosina
KL	Kit ligante
kg	Kilograma
LH	Hormônio luteinizante
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MOIFOPA	Manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
SRD	Sem raça definida
TGF-α	Fator de crescimento transformante-α
TGF-β	Fator de crescimento transformante-β
TZP	Processos citoplasmáticos transzonais
TR	Taxa de recuperação
VG	Vesícula germinativa
∅	Diâmetro

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Características morfométricas dos ovários de marrãs pré-púberes segundo o comprimento, largura, espessura, peso e volume. Valores médios e desvio padrão.....	29
Tabela 2	Número médio de FOPA isolados em várias espécies utilizando procedimentos enzimáticos e mecânicos segundo diferentes autores.....	31
Tabela 3	Classificação de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes quanto à presença de células da granulosa após isolamento mecânico.....	33
Tabela 4	Classificação de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes avaliados quanto à viabilidade após procedimento mecânico de isolamento.....	36
Tabela 5	Número médio, morfometria e porcentagem de folículos pré-antrais de fêmeas suínas pré-púberes avaliados histologicamente (média e erro padrão).....	40

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Metodologia para isolamento, quantificação, classificação e análise qualitativa de FOPA de suínos.....	25
Figura 2	Tissue chopper utilizado na fragmentação do tecido ovariano.....	25
Figura 3	Ovário de fêmea suína pré-púbere com presença de folículos antrais.....	30
Figura 4	Ovário de matriz suína com presença de folículos antrais e corpo lúteo.....	30
Figura 5	Relação entre o peso do ovário (g) e o número de FOPA isolados pelo procedimento mecânico de ovários de fêmeas suínas.....	32
Figura 6	Folículos primordiais (seta), após digestão enzimática, maiores e mais escuros do que as células somáticas.....	32
Figura 7	Folículos pré-antrais (setas) isolados de ovários de fêmeas suínas após processamento mecânico observados em microscópio invertido 200x.....	33
Figura 8	Classificação de folículos pré-antrais quanto à cobertura de células da granulosa. (A) folículo primordial (seta) em contraste de fase. (B) folículo primordial desnudo (seta) marcado com Hoechst 33342. Nota-se a ausência de células da granulosa circundando o ovócito e presença de células somáticas dispersas (*). Microscopia de fluorescência (A/B – Barra corresponde 20 μ m).....	34
Figura 9	Classificação de folículos pré-antrais quanto à cobertura de células da granulosa. (C) folículo primordial (seta) em contraste de fase. (D) folículo primordial marcado com Hoechst 33342, parcialmente coberto com células da granulosa (*) circundando o ovócito (seta). Microscopia de fluorescência (C/D – Barra corresponde 20 μ m).....	35
Figura 10	Classificação de folículos pré-antrais quanto à cobertura de células da granulosa. (E) folículo primordial (seta) em contraste de fase. (F) folículo primordial marcado com Hoechst 33342, totalmente coberto com células da granulosa (*) circundando o ovócito. Microscopia de fluorescência (E/F – Barra corresponde 20 μ m).....	35

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 11	Avaliação da viabilidade de folículos pré-antrais isolados de fêmeas suínas pré-púberes. (A) Folículos primordiais (seta) e células somáticas dispersas (*) em contraste de fase. (B) Folículos primordiais não viáveis com núcleos marcados com iodeto de propídeo (seta), folículos primordiais viáveis (círculo) e células somáticas viáveis (^v) e não viáveis (ⁿ). Microscopia confocal (A/B – Barra corresponde 20 μm).....	37
Figura 12	Avaliação da viabilidade de folículos pré-antrais isolados de fêmeas suínas pré-púberes. (C) Folículos primordiais (seta) e células somáticas dispersas (*) em contraste de fase. (D) Folículo primordial não viável com núcleo marcado pelo iodeto de propídeo (seta), folículo primordial viável não marcado (círculo) e células somáticas dispersas não viáveis (*). Microscopia de fluorescência (A/B – Barra corresponde 20 μm).....	37
Figura 13	Corte histológico (HE). Folículo primordial de marrãs. Ovócito circundado por células da granulosa de forma pavimentosa e cubóide (Barra corresponde 20 μm).....	38
Figura 14	Corte histológico (HE). Folículo primário de marrãs pré-púberes. Ovócito circundado por uma camada de células da granulosa de forma cubóide (Barra corresponde 20 μm).....	38
Figura 15	Corte histológico (HE). Folículo secundário de marrãs pré-púberes. Ovócito circundado por mais de uma camada de células da granulosa de forma cubóide (Barra corresponde 20 μm).....	39

ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE SUÍNOS

RESUMO - Objetivou-se neste estudo verificar se os folículos pré-antrais de fêmeas suínas podem ser isolados por procedimento mecânico, com intuito de se obter um expressivo número de folículos viáveis. Ovários de fêmeas suínas pré-púberes (n=20) foram seccionados longitudinalmente em duas partes. Uma metade foi utilizada para o procedimento mecânico simples e a outra no processamento histológico. O número médio de folículos recuperados por ovário no procedimento mecânico foi de 599160,00 variando entre 30400,00 e 1200800,00 havendo relação ($P < 0,05$) entre as variáveis peso ovariano e número de folículos recuperados. Com relação à qualidade 76,44% estavam viáveis após o isolamento mecânico. Quanto à presença de células da granulosa ao redor do ovócito 35,67% e 60,27% estavam desnudos e parcialmente cobertos e 4,06% totalmente cobertos. O total de folículos pré-antrais estimados *in situ* foi de 131937,78, variando entre 67599,04 e 291897,51. A distribuição da população, o diâmetro e o número de células da granulosa, observados *in situ*, foram de 89,41%, 33,04 μ m e 5,88 para os folículos primordiais, 2,61%, 47,59 μ m e 16,45 para os primários e de 7,98%, 79,11 μ m e 46,27 para os secundários. Conclui-se que o procedimento mecânico pode ser utilizado com sucesso no isolamento de folículos pré-antrais viáveis de fêmeas suínas pré-púberes.

Palavras-chave: ovário, ovócito, folículo primário, folículo primordial, tissue chopper

ISOLATION, QUANTIFICATION AND CLASSIFICATION OF PORCINE PREANTRAL FOLLICLES

ABSTRACT – The aim of this study was verify the possibility of isolate of porcine preantral follicles by mechanical procedure, in order to obtain an expressive number of viable follicles. Porcine prepubertal female ovaries (n=20) were longitudinally seccionated in two parts. One half was used for simple mechanical procedure and the other half for histological procedure. The average of recovered follicles per ovary by mechanical procedure was 599,160 ranging from 30,400 and 1,200,800 with a direct relationship ($P<0.05$) between ovarian weight and recovered follicles. In relation of quality 76.44% were viable after mechanical isolation. The presence of granulosa cells around the oocyte 35.67% and 60.27% were denuded and partially covered with granulosa cells and 4.06% was totally covered. The preantral follicles estimated in situ was 131,937,78 ranging on 67,599,04 and 291,897,51. The population distribution, diameter and number of granulosa cells, observed in situ, were 89.41%, 33.04 μ m and 5.88 on primordial follicles, 2.61%, 47.59 μ m and 16.45 on primary follicles and 7.98%, 79.11 μ m and 46,27 on secondary follicles. In conclusion, the mechanical procedure can be used with success on isolation of viable preantral follicles of porcine prepubertal females.

Key words: ovary, oocyte, primary follicle, primordial follicle, tissue chopper

1. INTRODUÇÃO

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas ligadas à reprodução animal têm como finalidade o aumento da eficiência reprodutiva. Neste contexto, o ovário de mamíferos possui milhares de ovócitos inclusos em sua maioria (cerca de 90%) nos folículos pré-antrais. Apesar deste enorme capital ovocitário, uma ínfima proporção destes (0,1%) será ovulada e, conseqüentemente, poderá ter alguma possibilidade de ser fecundada (GONÇALVES *et al.*, 2001). Tendo em vista essa grande perda folicular, o isolamento e cultivo de folículos pré-antrais *in vitro* têm sido tema de estudo (RODRIGUES *et al.*, 1998).

De acordo com Figueiredo *et al.* (1993) e Telfer *et al.* (1999) a manipulação *in vitro* de ovócitos recuperados da população de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), além de servir de modelo nas investigações sobre os complexos mecanismos da foliculogênese, tem um grande impacto na reprodução assistida de espécies em extinção. As possibilidades de emprego dos FOPA em sistemas de crescimento, maturação e fecundação *in vitro* abrem um leque de novas alternativas para a seleção e melhoramento genético animal.

O fornecimento de uma população homogênea de ovócitos oriundos de um mesmo animal proporcionado pela biotécnica de manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) contribuirá também para a padronização de técnicas, como a clonagem, FIV e transgênese, uma vez que será utilizada uma população de ovócitos num mesmo estágio de desenvolvimento e de mesma origem. Outra conseqüência imediata desta biotecnologia é a possibilidade de congelamento de FOPA isolados ou *in situ* (no interior de tecido ovariano) a qual poderia ter uma importância capital na constituição de bancos de germoplasma animal, visando a conservação de ovócitos de animais de alto valor zootécnico e/ou em perigo de extinção (AMORIM *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* têm mostrado resultados bastante satisfatórios com animais de laboratório. Eppig e O' Brien (1996) obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Mais recentemente, esta mesma equipe, aperfeiçoando o protocolo utilizado anteriormente, relatou a produção de embriões e o nascimento de 59 camundongos

saudáveis a partir de folículos pré-antrais cultivados, maturados e fecundados *in vitro* (O'BRIEN *et al.*, 2003). Com relação aos estudos com espécies domésticas, os resultados mais satisfatórios foram com suínos e caprinos onde se chegou até o estágio de blastocisto após cultivo, maturação e fecundação de folículos secundários *in vitro* (WU *et al.*, 2001; FIGUEIREDO, 2009a). Anteriormente, Hirao *et al.* (1994) obtiveram a ovulação *in vitro* a partir de folículos pré-antrais isolados de suínos que cresceram e maturaram em sistema de cultivo. No caso das outras espécies mamíferas, como por exemplo: bovino, caprino e ovino foi obtida a formação de antro a partir de folículos secundários isolados e cultivados *in vitro* (CECCONI *et al.*, 1999; GUTIERREZ *et al.*, 2000; HUANMIN e YONG, 2000).

Apesar do desenvolvimento de folículos antrais ter sido amplamente descrito, principalmente em bovinos, informações referentes à fisiologia dos FOPA, necessitam de mais pesquisas. É sabido, por estudos histológicos, que os folículos primordiais são ativados e transformam-se, sucessivamente, em folículos intermediários, primários e secundários. Contudo, não são conhecidos com exatidão os fatores que promovem ou inibem a ativação dos folículos primordiais, bem como aqueles implicados no controle do crescimento de folículos primários e secundários. Em resumo, a fase pré-antral compreende um período obscuro e pouco conhecido da foliculogênese sendo, portanto, um vasto campo para investigações científicas (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Nesse sentido, diversas pesquisas (TELFER *et al.*, 2000; EPPIG, 2001; MAO *et al.*, 2002; SHUTTLEWORTH *et al.*, 2002; FORTUNE, 2003; MAO *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2005) estão atualmente priorizando o desenvolvimento de meios de cultivo eficientes que promovam a maturação de milhares de ovócitos oriundos dos folículos pré-antrais, o que possibilitaria a produção em larga escala de animais de alta produtividade.

Objetivou-se neste estudo verificar se os folículos pré-antrais de fêmeas suínas podem ser isolados por procedimento mecânico, quantificando e classificando-os quanto à qualidade. Também se pretendeu avaliar histologicamente os ovários para determinar a eficiência do procedimento de isolamento mecânico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Pensando em maximizar o aproveitamento do potencial reprodutivo, principalmente de fêmeas domésticas, é importante obter maior conhecimento sobre os mecanismos que controlam os processos de formação e atresia de folículos.

2.1 Ovário de mamíferos

É um órgão composto por vários tipos celulares diferenciados e pode ser dividido em duas regiões: uma medular, que na maioria das espécies, consiste na porção interna do ovário e é constituída por tecido conjuntivo, nervos, artérias e veias e uma região cortical que contém corpos lúteos, albicans e folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. Além dos nutrientes e hormônios provenientes da corrente sanguínea, fatores produzidos pelos diferentes tipos celulares contribuem para a formação de um sistema bastante complexo que regula as funções do ovário, ou seja, a produção de gametas e hormônios (LEITÃO *et al.*, 2009).

No ovário cada ovócito associado a um folículo possui o potencial de gerar um novo indivíduo e, assim, perpetuar a espécie. Para que tal potencial seja realizado, uma sequência de eventos complexos e altamente controlados deve ocorrer de forma dinâmica e ordenada. Tais eventos incluem a formação do conjunto de folículos que estará presente nos ovários ainda durante a fase fetal, a ativação de folículos para iniciarem o crescimento e o correto funcionamento de forma a maximizar a chance do ovócito ser fertilizado, desenvolver uma gestação de sucesso e gerar um novo indivíduo apto à reprodução (BINELLI *et al.*, 2009).

2.2 Ovogênese

Pode ser definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) da fêmea até a formação do ovócito haplóide apto a ser fecundado. Antes de ser

incluso no folículo ovariano, a célula ovocitária é precedida da evolução de dois tipos celulares, as CGP e as ovogônias (MARTINS *et al.*, 2008).

As CGP tem origem extragonadal e são formadas durante o período embrionário nessa ordem: após a fecundação do ovócito pelo espermatozoide é formado o zigoto que evoluirá ao estágio de blastocisto. Este por sua vez, é constituído por duas estruturas, o trofotoderma ou trofoblasto e o botão embrionário ou embrioblasto. A partir do botão embrionário, três folhetos serão originados: o ectoderma, o mesoderma e o endoderma. Deste último será formado, dentre várias estruturas, o saco vitelínico, do qual serão originadas as CGP, as quais se caracterizam por serem móveis e altamente invasivas. Ainda na vida fetal, nas espécies bovina e ovina, as CGP migram para o mesênquima da crista genital e colonizam a gônada indiferenciada. Neste momento as células perdem sua característica móvel e iniciam mitose e após este processo de proliferação celular, as CGP no ovário, diferenciam-se em ovogônias. Estas passarão por sucessivas mitoses e entrarão na primeira divisão meiótica sendo denominadas de ovócitos primários ou imaturos. O processo de meiose será interrompido (primeira parada) no estágio de diplóteno ou dictioteno ou de vesícula germinativa (VG), ficando assim até que o animal atinja a puberdade. Após o início da liberação pré-ovulatórias de hormônio luteinizante (LH) na puberdade, horas antes da ovulação, a meiose é retomada e o núcleo ovocitário entra em diacinese, ocorrendo rompimento da VG e expulsão do primeiro corpúsculo polar, resultando na formação do ovócito secundário que progredirá até a metáfase II, ocorrendo a segunda parada da meiose que será retomada somente após a fecundação do espermatozoide seguido da expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do óvulo fecundado (GONÇALVES *et al.*, 2001; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

2.3 Foliculogênese

É o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e terminando com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo De Graaf ou pré-ovulatório. A foliculogênese pode ser dividida em duas fases: a) fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos

folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; b) fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (LEITÃO *et al.*, 2009).

A função do folículo ovariano é proporcionar um ambiente ideal para a manutenção da viabilidade, bem como, o crescimento e maturação do ovócito (GONÇALVES *et al.*, 2001). São classificados de acordo com o grau de evolução em pré-antrais, compreendendo os primordiais, primários e secundários, e em antrais, caracterizados pela presença de uma área preenchida por fluido folicular, em que, a partir de então, passam a ser subclassificados como terciários e pré-ovulatórios (LEITÃO *et al.*, 2009). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular (MACHADO *et al.*, 2002).

2.3.1 Folículos primordiais

Os folículos primordiais são unidades compartimentais que alojam células germinativas e um número variado de células somáticas. Estes pequenos folículos representam a unidade de desenvolvimento fundamental do ovário de mamíferos, e como tal irão suprir as necessidades de toda a vida reprodutiva. Consistem em um ovócito imaturo localizado no centro do folículo, circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa demarcada por uma lâmina basal que os separa do estroma ovariano (PICTON, 2000). Estão localizados na região periférica do córtex ovariano, constituindo o pool de reserva de folículos quiescentes e compreendem 90% de toda a população folicular do ovário de mamíferos (GREENWALD e MOOR, 1989).

2.3.2 Folículos primários

Conforme reportado por Van Den Hurk e Zhao (2005) os folículos primordiais permanecem “adormecidos” até o seu recrutamento. Todos os dias um grupo de folículos primordiais são recrutados e estudos morfométricos sugerem que esses folículos iniciam o crescimento com base na ordem em que eles são formados. Conseqüentemente, folículos primordiais transformam-se em primários após alguns

dias ou até um ano em roedores, e nas mulheres podem demorar até cinco décadas. São chamados de folículos primários quando a única camada de células da granulosa em torno do ovócito se torna cúbica. Nesta transição a taxa de maturação é a mais lenta do processo de crescimento, com pouca alteração no diâmetro do ovócito.

2.3.3 Folículos secundários

A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas dessas células ao redor do ovócito, formando o folículo secundário (LEITÃO *et al.*, 2009). Nestes folículos, em estádios mais avançados, as fibras de tecido conjuntivo organizam-se paralelamente à lâmina basal para formar a camada de células tecais e a zona pelúcida pode ser identificada (GONÇALVES *et al.*, 2001). Eles atingem um diâmetro de aproximadamente 150 (bovino), 200 (roedores, humanos) e 300 μm (suínos) enquanto os ovócitos apresentam diâmetro máximo de 60 (bovino), 70 (roedores), 80 (humanos) e 90 (suínos) μm (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

2.3.4 Folículos terciários

Com a intensa proliferação das células da granulosa, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. O fluido antral pode servir como uma importante fonte de substâncias regulatórias derivadas do sangue ou de secreções das células foliculares, ou seja, gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas e lipoproteínas. 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 folículo antral (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Segundo Fortune (1994), a formação da cavidade antral em mamíferos é observada quando o folículo atinge 200 a 400 μm de diâmetro. Mao *et al.* (2002) analisaram a formação de antro, em fêmeas suínas pré-púberes, baseados no

diâmetro folicular e observaram uma maior proporção (46,2%) de formação de antro naqueles folículos acima de 250 μm de diâmetro.

2.4 Ativação folicular

Entende-se por ativação folicular o processo irreversível pelo qual folículos primordiais entram em crescimento. Com a ativação ocorre aumento gradual no diâmetro do ovócito, proliferação e mudança na conformação das células da granulosa de achatadas para cubóides. A ativação de folículos ocorre continuamente, de forma que a taxa de ativação está negativamente relacionada ao número de folículos quiescentes (não ativados) remanescentes no ovário, que está por sua vez relacionado ao potencial reprodutivo vitalício da fêmea. Os mecanismos que controlam a ativação de folículos permanecem pouco elucidados, principalmente em animais de interesse zootécnico (BINELLI *et al.*, 2009). Entretanto, acredita-se que a ativação inicial é pouco dependente de gonadotrofinas, sendo provavelmente influenciado por fatores intraovarianos (LEITÃO *et al.*, 2009), como a ativina, EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), TGF- α (Transforming Growth Factor-alfa), TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) e IGF-1 (Insulin-like Growth Factor).

Alguns estudos têm mostrado que a comunicação parácrina entre o ovócito e as células da granulosa é mediada por vários fatores de crescimento dentre eles o fator de células tronco KL (Kit ligante) e membros da família dos TGF- β , particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) também conhecida como GDF-9B (McNATTY, *et al.*, 1999; SAHA *et al.*, 2000; BURATINI Jr, 2007).

O ovócito participa ativamente na indução da proliferação e diferenciação das células da granulosa. Para tanto, a comunicação intercelular é proporcionada por processos citoplasmáticos transzonais (TZP) além da secreção de mediadores parácrinos. Os TZP são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do ovócito, onde junções do tipo gap permitem transporte bidirecional de moléculas reguladoras (ALBERTINI *et al.*, 2001).

Em resumo, as pesquisas atuais têm focalizado na identificação dos fatores e condições fisiológicas que causam a ativação gradual dos folículos ao longo da vida da fêmea. A manipulação desse processo visando o controle da dinâmica de ativação pode aumentar a eficiência reprodutiva das espécies domésticas e contribuir para a preservação da fauna ameaçada de extinção (BINELLI *et al.*, 2009).

2.5 Aplicações da biotécnica da MOIFOPA

No laboratório a utilização de FOPA para cultivo *in vitro* e/ou criopreservação no âmbito das pesquisas fundamental e aplicada é precedida do emprego de métodos eficazes que permitam o isolamento de um grande número de FOPA a partir dos ovários. Na literatura, os primeiros registros de estudos de FOPA isolados, respectivamente, em animais de laboratório (GROB, 1964; camundongo) e domésticos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; bovinos) ocorreram nas décadas de 60 e 90 utilizando-se procedimentos enzimáticos e mecânicos, respectivamente. O princípio dos métodos 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 isto, instrumentos mecânicos associados ou não aos químicos ou enzimáticos. Nos procedimentos mecânicos, os equipamentos mais comumente utilizados são o tissue chopper, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes. Referente aos processos enzimáticos, as enzimas proteolíticas mais utilizadas são a colagenase, tripsina e pronase, sendo a primeira empregada na maioria dos trabalhos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Métodos enzimáticos de isolamento de folículos pré-antrais foram descritos não apenas em animais de laboratório (camundongo: CARROL *et al.*, 1991; rato: DANIEL *et al.*, 1989; hamster: ROY e GREENWALD, 1985), mas também em suínos (GREENWALD e MOOR, 1989; HIRAO *et al.*, 1994; TELFER, 1996; TELFER *et al.*, 2000; KERONG *et al.*, 2007), gatos (JEWGENOW e PITRA, 1993), fetos bovinos (CARAMBULA *et al.*, 1996a), fetos ovinos (CARAMBULA *et al.*, 1996b), galinhas domésticas (DU *et al.*, 2006), cadelas (DURRANT *et al.*, 1998) e humanos (ROY e TREACY, 1993). Em contraste aos procedimentos enzimáticos, métodos mecânicos

têm sido mais comumente usados para o isolamento de folículos pré-antrais de ovários bovinos (HULSHOF *et al.*, 1994; LUCCHI *et al.*, 2002; BASSO e ESPER, 2002; BASSO *et al.*, 2007), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 1998; LUCCHI *et al.*, 1999) e ovinos (CECCONI *et al.*, 1999; AMORIM *et al.*, 2000).

Tendo em vista a grande perda folicular que ocorre naturalmente nos ovários, a biotécnica de MOIFOPA (ovário artificial) visa simular *in vitro* as condições necessárias para que pequenos FOPA recuperados dos ovários possam sobreviver, crescer, maturar e posteriormente serem fecundados *in vitro*, minimizando o impacto da perda folicular originada pelo processo de atresia que ocorre largamente nos ovários. Assim a biotécnica de MOIFOPA tem importantes aplicações nas seguintes áreas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009b):

1. Pesquisa fundamental ou básica. Possibilita o estudo *in vitro* do efeito de diferentes substâncias sobre os FOPA visando elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial;
2. Biologia molecular. Assegura as condições necessárias para identificar e quantificar, nos diferentes compartimentos foliculares, a expressão dos genes que são responsáveis pelo controle do crescimento de folículos pré-antrais e antrais;
3. Indústria farmacêutica. Permite a realização de testes *in vitro* da ação de fármacos sobre os folículos preliminarmente ao seu emprego em experimentos envolvendo animais e seres humanos;
4. Nanotecnologia. Oferece um importante modelo para testar a inocuidade de nanopartículas utilizadas no carreamento de drogas de interesse médico;
5. Biossegurança. Ferramenta importante para se avaliar o efeito da radioatividade sobre a sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento folicular;
6. Formação de bancos genéticos. Constituição de bancos de germoplasma tanto na espécie humana como em animais de interesse zootécnico ou em vias de extinção visando posterior produção *in vitro* de embriões ou xenotransplante;
7. Reprodução humana assistida. Alternativa futura para o aprimoramento de meios de cultura visando a maturação ovocitária e a produção de embriões humanos *in vitro*. Outra aplicação seria a preservação da fertilidade feminina nos casos de mulheres que se submeteram a tratamentos de radio ou quimioterapias (casos de

câncer) e que necessitam ter seus ovários previamente removidos e criopreservados para posterior autotransplante ou cultivo *in vitro*;

8. Multiplicação de animais. No futuro possibilitará a produção *in vitro* de embriões em larga escala a partir de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais, recuperados de ovários inteiros ou de fragmentos ovarianos (biopsia), que seriam submetidos aos procedimentos de crescimento, maturação e fecundação *in vitro*;

9. Bem-estar animal. Por se tratar de um modelo exclusivamente *in vitro* para a produção de embriões;

10. Desenvolvimento de vacinas. Modelo *in vitro* importante para avaliação da eficiência de anticorpos na destruição/eliminação folicular como etapa preliminar à realização de testes em animais vivos. Este procedimento minimiza o número de animais necessários nos experimentos. As referidas vacinas poderão ser utilizadas em procedimentos e imunoesterilização visando notadamente o controle populacional de caninos e felinos, por exemplo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi realizado nos laboratórios de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e no setor de Citologia, Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de junho a dezembro de 2009.

3.2 Animais

Foram utilizados 20 ovários de fêmeas suínas pré-púberes SRD, entre 4 e 6 meses de idade e peso médio de 90,0 Kg, abatidas em frigorífico localizado no município de Uberlândia – MG.

3.3 Coleta do material e procedimentos

Após o abate os ovários foram coletados, lavados com tampão fosfato salino (PBS) e armazenados em tubos plásticos (Corning®) com 50 mL de PBS a uma temperatura de 4°C (CHAVES *et al.*, 2008) e conduzidos ao laboratório dentro de uma caixa térmica.

3.4 Morfometria ovariana, isolamento mecânico folicular e quantificação de FOPA

Antes de iniciar o processo de isolamento mecânico folicular os ovários foram avaliados morfometricamente quanto ao comprimento (cm), largura (cm), espessura (cm) e peso (g) utilizando-se um paquímetro e uma balança de precisão com sensibilidade de 0,01 cm e 0,01 g, respectivamente. Após a obtenção dos dados morfométricos os folículos antrais superficiais foram puncionados para a eliminação do líquido folicular e com uma lâmina de bisturi cada ovário foi seccionado

longitudinalmente em duas partes (Figura 1). Uma metade foi utilizada no procedimento mecânico de isolamento e a outra no processamento histológico para quantificação folicular e avaliação morfométrica *in situ*.

O procedimento mecânico de isolamento folicular foi realizado com o aparelho denominado tissue chopper (Figura 2; The Mickle Laboratory Engineering CO., Gomshal, Surrey, England, FIGUEIREDO *et al.*, 1993; RODRIGUES *et al.*, 1998) previamente regulado para execução de cortes seriados em intervalos de 200 µm (ALVES *et al.*, 2009). Para se obter uma fragmentação eficiente durante o processamento, o ovário no cortador de tecidos foi umedecido com solução de PBS e os cortes foram realizados nos eixos longitudinal, transversal e oblíquo da região externa para a interna do córtex ovariano (BASSO e ESPER, 2002; LUCCI *et al.*, 2002).

Os fragmentos ovarianos obtidos foram lavados com 20 mL de PBS e armazenados em tubos plásticos de 50 mL (Corning®). Em seguida a suspensão foi dissociada mecanicamente por repetidos movimentos de sucção e ejeção, utilizando-se sucessivamente pipetas de Pasteur de 1600 µm (40 movimentos) e 600 µm (40 movimentos) de diâmetro. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em malhas de náilon de 500 µm e 100 µm de diâmetro, com a finalidade de separar os fragmentos de tecido ovariano com dimensões maiores que 100 µm que ficaram retidos nas malhas, os FOPA.

Para estimar a quantidade de FOPA, o filtrado resultante de 20 mL foi cuidadosamente agitado para a dispersão dos folículos, depois 2 amostras de 100 µL foram retiradas e colocadas em placa de Petri 60x15 mm (Nutricell®) sob microscópio invertido (Motic® AE21 Trino) para a quantificação dos folículos com objetiva de 20x. Para estimar o número total de FOPA em cada ovário adotou-se a seguinte fórmula (AMORIM *et al.*, 2000):

$$\text{Total FOPA/Ovário} = \frac{\text{Nº de FOPA Amostra 1} + \text{Nº de FOPA Amostra 2}}{2} \times 400^*$$

*A média encontrada nas amostras 1 e 2 que correspondem a metade ovariana, foi multiplicada por 10 para calcular o valor em 1 mL. O resultado foi multiplicado pela suspensão final de 20 mL. Para estimar o valor total por ovário multiplicou-se por 2, portanto: 10 x 20 x 2 = 400

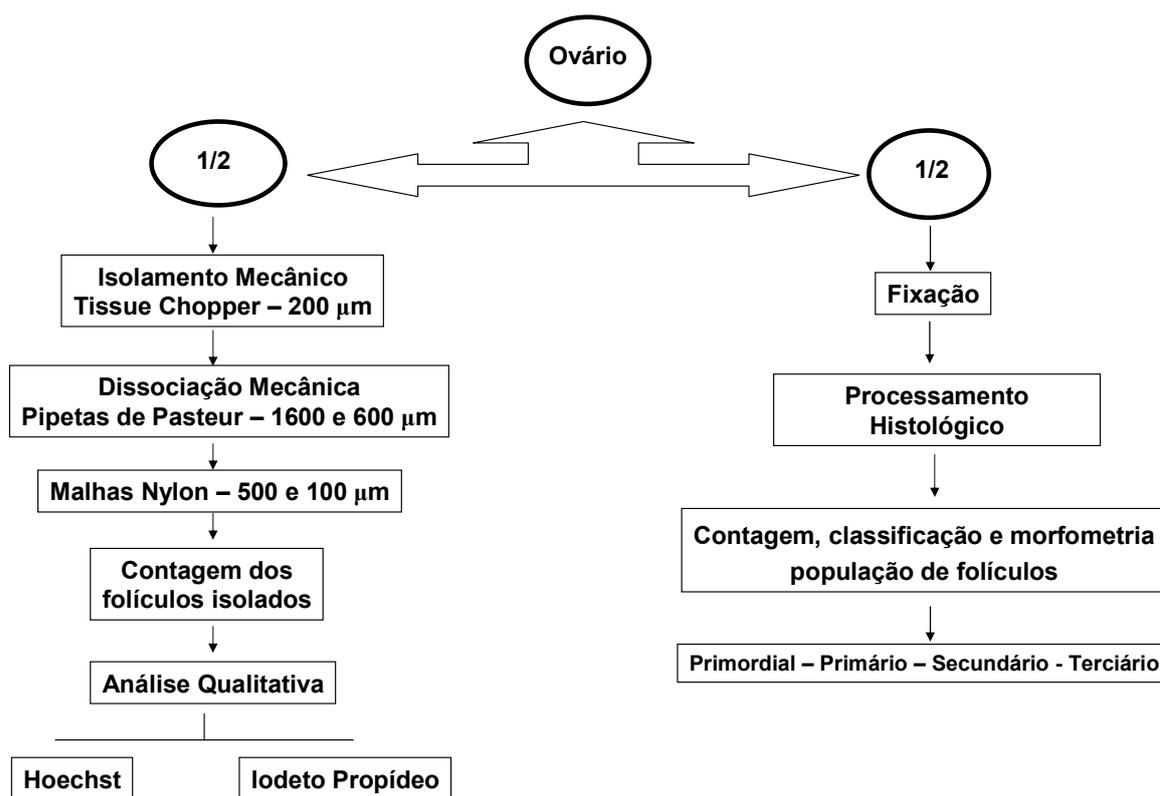


Figura 1 – Metodologia para isolamento, quantificação, classificação e análise qualitativa de FOPA de suínos.



Figura 2 – Tissue chopper utilizado na fragmentação do tecido ovariano.

3.5 Análise qualitativa de FOPA isolados pelo procedimento mecânico

Para analisar as células da granulosa dos FOPA isolados a fresco, utilizou-se o corante bisbenzimidine Hoechst 33342 (Invitrogen® H1399). Uma alíquota de 1 µL do corante foi adicionada em 1000 µL (concentração final de 10 µg/mL) do pool de FOPA isolado e, em seguida, armazenado em tubos plásticos (Eppendorf® 3810) de 1,5 mL, protegido da luz durante 30 minutos a 37°C em estufa. Após incubação foram retirados 30 µL e colocados em lâmina e lamínula para leitura em microscópio de varredura a laser confocal (Laser Scanning Microscope® – LSM 510 Meta) acoplado com microscópio invertido (Axiovert® 200 M) com objetivas de 10x, 20x, 40x e 63x. Os folículos foram classificados de acordo com a presença de células da granulosa em torno do ovócito em totalmente cobertos, parcialmente cobertos e desnudos. Simultaneamente, para analisar a integridade da membrana dos ovócitos dos FOPA isolados a fresco, utilizou-se o corante nuclear iodeto de propídeo (Invitrogen® P3566). Uma alíquota de 60 µL do corante foi adicionada em 60 µL (concentração final de 10 µg/mL) do pool de FOPA isolado e, posteriormente, armazenado em tubos plásticos de 1,5 mL, protegido da luz durante 30 minutos a 37°C em estufa. Após incubação o mesmo procedimento de leitura foi adotado para a microscopia de varredura a laser confocal. O iodeto de propídeo não penetra na membrana de células viáveis (MATOS *et al.*, 2007), portanto os folículos foram classificados em viáveis (não corados) e não viáveis (corados).

3.6 Processamento histológico, morfometria e quantificação folicular

O processo de histologia clássica compreende as seguintes etapas: fixação, desidratação, diafanização ou clarificação, infiltração, inclusão, microtomia e coloração de lâminas. Para estimar a população de FOPA *in situ* e comparar os resultados com o procedimento de isolamento mecânico simples, metade de cada ovário foi fixado em formol tamponado por 24 horas. Após inclusão em parafina, o ovário foi dividido em 5 blocos, seccionados serialmente na espessura de 6 µm, retirando-se 2 lâminas por bloco em intervalos de 1000 µm, totalizando 200 lâminas

que foram coradas com hematoxilina e eosina. Realizou-se a leitura por microscopia de luz convencional com objetiva de 10x e 40x. A quantificação e as mensurações foram feitas por meio do software HL Image® 97, o qual foi utilizado na avaliação das imagens digitalizadas obtidas em microscópio (Olympus® Triocular BX40) com câmera OLY-200 acoplada, ligada a um computador com placa digitalizadora Data Translation 3153. Para mensuração dos ovócitos a lâmina basal foi considerada como limite exterior e o diâmetro foi tomado como a média dos eixos maiores e menores em ângulo reto nas secções onde o núcleo e o nucléolo foram observados. Para estimar o diâmetro do núcleo o mesmo processo foi adotado.

A classificação dos folículos pré-antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento foi realizada segundo Hulshof *et al.* (1994) em:

a) Primordiais: ovócitos circundados por uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa;

b) Primários: ovócitos circundados por uma camada de células da granulosa de forma cúbica;

c) Secundários: ovócitos circundados por mais de uma camada de células da granulosa de forma cúbica e;

d) Terciários: múltiplas camadas de células da granulosa em forma cubóide, formação do antro e presença de células da teca interna e externa (PICTON, 2000).

O número de FOPA *in situ* para cada ovário foi estimado segundo a fórmula modificada de Gougeon e Chainy (1987):

$$NT = \frac{No \times Cp}{So \times do}$$

Onde:

NT = Número total calculado de um tipo de folículo;

No = Número de folículos contados;

Cp = Comprimento do ovário;

So = Número total de cortes observados;

do = diâmetro médio do ovócito de cada tipo de folículo.

Para avaliar a taxa de recuperação (TR) de folículos, pelo método de isolamento mecânico em relação à quantificação *in situ*, a seguinte fórmula foi empregada (LUCCI *et al.*, 2002):

$$TR = \frac{\text{N}^\circ \text{ de FOPA Isolados procedimento mecânico simples}}{\text{N}^\circ \text{ de FOPA observados processamento histológico}} \times 100$$

3.7 Análise estatística

Os valores da média, desvio padrão e erro padrão das medidas morfométricas ovarianas e foliculares foram calculados com auxílio do software Bioestat® 5.0. Para analisar o diâmetro dos folículos, ovócitos e núcleos e compará-los entre as classes foliculares utilizou-se o teste paramétrico de Tukey. Os dados referentes à distribuição da população folicular, viabilidade e classificação quanto à presença de células da granulosa foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov para análise da normalidade e, em seguida avaliados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O coeficiente de correlação de Pearson analisou as variáveis peso ovariano e número de folículos isolados mecanicamente por ovário. Os testes foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período pré-púbere, os ovários (Figura 3) contêm numerosos pequenos folículos (2 a 4 mm de diâmetro) e vários (8 a 15) de tamanho médio (6 a 8 mm). Em marrãs pré-púberes à medida que estes folículos ovarianos se desenvolvem dá-se um aumento correspondente no peso dos ovários (HAFEZ, 1995). Dentre as características avaliadas (Tabela 1), o peso médio dos ovários de 3,33 g é semelhante ao reportado por Kerong *et al.* (2007) que observaram 3,43 g para fêmeas suínas pré-púberes. Por outro lado, os valores encontrados estão abaixo dos relatados por Moreira *et al.* (2006) que avaliando matrizes descartadas por performance reprodutiva, reportaram valores médios de 13,30 g. Tal fato se justifica pela idade das fêmeas observadas e pela presença de estruturas como o corpo lúteo (Figura 4), uma glândula altamente vascularizada e bastante densa em função da invasão de células do estroma e deposição de fibras reticulares, ao contrário dos folículos que são estruturas compostas por pequenas lacunas intercelulares preenchidas por fluido folicular, sendo estas menos densas e, portanto mais leves (BANKS, 1991).

Tabela 1 – Características morfométricas dos ovários de marrãs pré-púberes segundo o comprimento, largura, espessura, peso e volume. Valores médios e desvio padrão.

Nº Ovários	Comp. (cm)	Larg. (cm)	Esp. (cm)	Peso (g)	Vol. (cm ³)
20	2,50 ± 0,32	1,55 ± 0,22	0,93 ± 0,19	3,33 ± 0,66	3,55 ± 0,96



Figura 3 – Ovário de fêmea suína pré-púbere com presença de folículos antrais.



Figura 4 – Ovário de matriz suína com presença de folículos antrais e corpo lúteo.

O número médio de FOPA isolados (Figura 5) pelo procedimento mecânico foi de 599160 folículos por ovário com uma variação entre as amostras de 30400 a 1200800, havendo relação ($P < 0,05$) entre as variáveis peso e números de folículos isolados. Greenwald e Moor (1989) e Kerong *et al.* (2007) isolaram FOPA pelo procedimento enzimático utilizando um gradiente de Percoll e um citômetro de fluxo para separar os folículos das células somáticas, obtendo valores médios de 419000 e 779000 folículos primordiais por ovário de marrãs pré-púberes, respectivamente. Com relação ao isolamento de FOPA, independentemente do tipo de procedimento adotado (enzimático ou mecânico), pode-se separar de centenas a milhares destas estruturas por ovário, como demonstrado por vários autores (Tabela 2). Nota-se uma

eficiência do procedimento enzimático em isolar FOPA, principalmente na espécie suína (GREENWALD e MOOR, 1989; KERONG *et al.*, 2007), porém a utilização de enzimas pode causar danos à lâmina basal e ruptura das junções entre as células foliculares, prejudicando a viabilidade folicular em cultivo (WANDJI *et al.*, 1996; DU *et al.*, 2006).

Tabela 2 – Número médio de FOPA isolados em várias espécies utilizando procedimentos enzimáticos e mecânicos segundo diferentes autores.

Espécie	Procedimento	Nº de FOPA Isolados/Ovário	Autor
Bovino	Mecânico	52100,00	Lucci <i>et al.</i> (2002)
Caprino	Mecânico	1126,00	Rodrigues <i>et al.</i> (1998)
Felinos Não Domésticos	Mecânico	12500,00	Jewgenow e Stolte (1996)
Galinha Doméstica	Enzimático	400,00	Du <i>et al.</i> (2006)
Humanos	Enzimático	760,00	Roy e Treacy (1993)
Macaca-prego	Mecânico	45625,00	Domingues <i>et al.</i> (2003)
Ovino	Mecânico	2842,00	Amorim <i>et al.</i> (2000)
Suíno	Enzimático	419000,00	Greenwald e Moor (1989)
Suíno	Enzimático	779000,00	Kerong <i>et al.</i> (2007)

Uma observação relatada por Kerong *et al.* (2007) foi a dificuldade em identificar, após a dissociação enzimática, os folículos primordiais de células somáticas (Figura 6), apesar de os primeiros apresentarem-se mais escuros e de maior tamanho. As amostras, após serem processadas em citômetro de fluxo, apresentaram uma pureza de folículos primordiais de 82,43%.

Após o procedimento de isolamento observamos que durante a avaliação em gotas de 100 µL no microscópio invertido havia um grande número de estruturas (Figura 7) que dificultavam a contagem, o que justifica a grande variação e os altos valores médios de FOPA recuperados em nossa pesquisa. Segundo Telfer (1996) a

fêmea suína, por ser uma espécie poliovulatória com a presença de vários folículos antrais, implica uma grande contaminação das amostras preparadas com elevada presença de células do estroma.

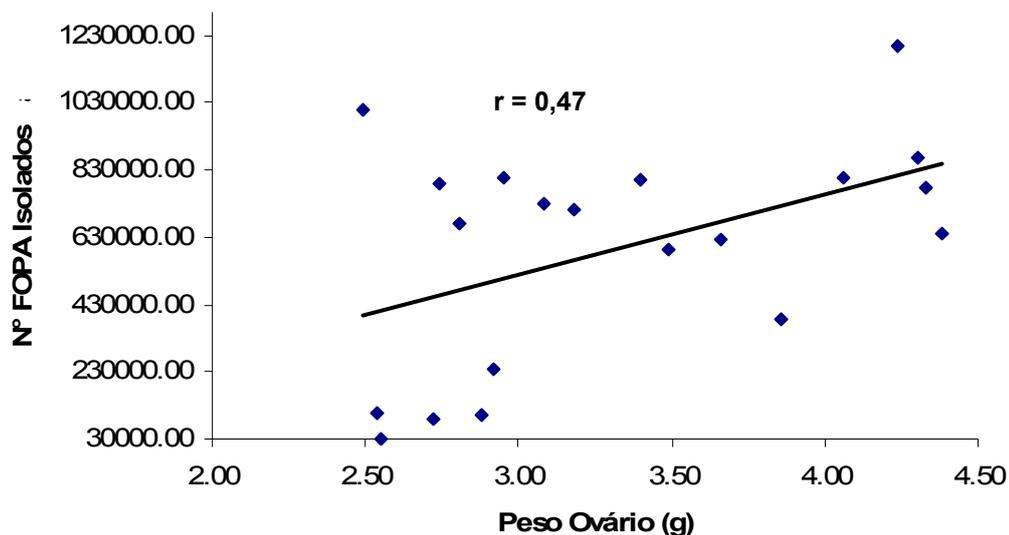


Figura 5 – Relação entre o peso do ovário (g) e o número de FOPA, isolados pelo procedimento mecânico, de ovários de fêmeas suínas pré-púberes.

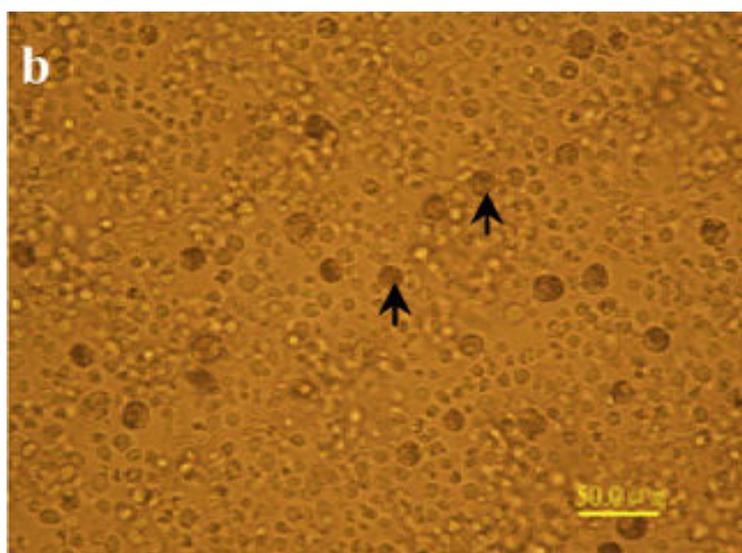


Figura 6 – Folículos primordiais (seta), após digestão enzimática, maiores e mais escuros do que as células somáticas (KERONG *et al.*, 2007).

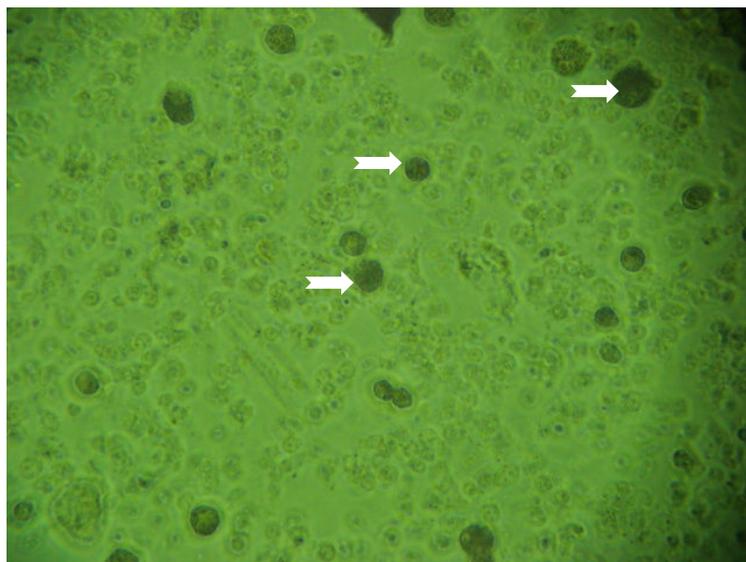


Figura 7 – Folículos pré-antrais (setas) isolados de ovários de fêmeas suínas após processamento mecânico observados em microscópio invertido 200x.

Imediatamente após o processamento mecânico avaliou-se a condição morfológica dos folículos pré-antrais isolados (Figuras 8, 9 e 10) utilizando o corante Hoechst 33342 o que possibilitou a visualização, por meio da microscopia de fluorescência, de células da granulosa individualmente, determinando a classificação apresentada na tabela 3.

Tabela 3 – Classificação de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes quanto à presença de células da granulosa após isolamento mecânico.

Total de Folículos Pré-antrais Avaliados	T/Cob (%)	P/Cob (%)	Desnudos (%)
443	4,06 (18/443) ^x	60,27 (267/443) ^y	35,67 (158/443) ^z

T/Cob: Folículos pré-antrais totalmente cobertos com células da granulosa

P/Cob: Folículos pré-antrais parcialmente cobertos com células da granulosa

Desnudos: Folículos pré-antrais sem a cobertura de células da granulosa

Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente. (^{x,y,z} P<0,05) Teste de Mann-Whitney.

Do total de 443 FOPA avaliados, 4,06% foram classificados como totalmente cobertos, 60,27% parcialmente cobertos e 35,67% desnudos.

Jewgenow (1998), avaliando o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de felinos domésticos, após isolamento mecânico, observou que antes do cultivo *in vitro* 53,7% dos folículos possuíam entre 31 e 50 células da granulosa e após 5 dias de cultivo 43,2% dos folículos estavam cercados com menos de 20 células da

granulosa. Eppig (1992) relatou em seu estudo uma dispersão das células da granulosa durante o cultivo *in vitro* de folículos isolados enzimaticamente. Tal fato foi observado por Kerong *et al.* (2007), que verificaram a presença parcial de células da granulosa após utilização da colagenase. Du *et al.* (2006) reportaram um índice de 38,7% de desnudamento dos folículos primários após isolamento enzimático e cultivo *in vitro* de 5 dias.

Comparando a eficiência dos procedimentos mecânico e enzimático no isolamento de folículos pré-antrais de fetos caprinos, Machado *et al.* (2002) notaram que a porcentagem de ovócitos desnudos foi superior quando adotado o sistema enzimático. Entretanto, o procedimento mecânico apresentou menor índice de folículos pré-antrais viáveis (75,0% versus 85,6%) em relação ao enzimático.

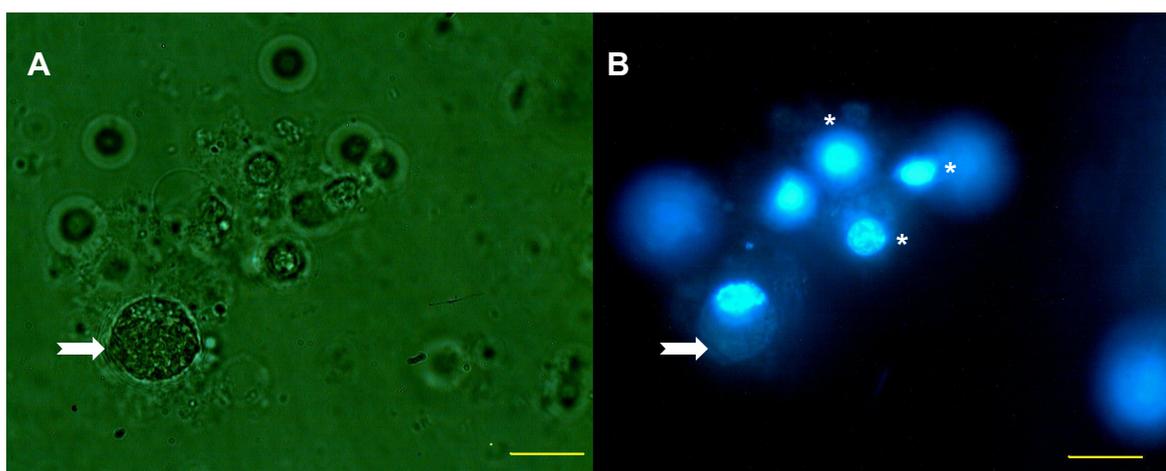


Figura 8 – Classificação de folículos pré-antrais quanto à cobertura de células da granulosa. (A) folículo primordial (seta) em contraste de fase. (B) folículo primordial desnudo (seta) marcado com Hoechst 33342. Nota-se a ausência de células da granulosa circundando o ovócito e presença de células somáticas dispersas (*). Microscopia de fluorescência (A/B – Barra corresponde 20 μ m)

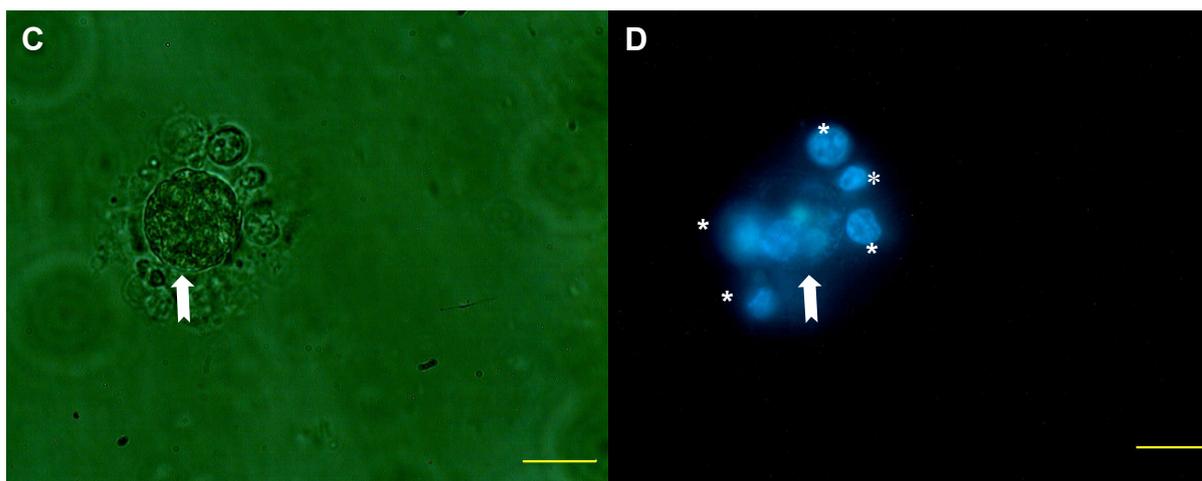


Figura 9 – Classificação de folículos pré-antrais quanto à cobertura de células da granulosa. (C) folículo primordial (seta) em contraste de fase. (D) folículo primordial marcado com Hoechst 33342, parcialmente coberto com células da granulosa (*) circundando o ovócito (seta). Microscopia de fluorescência (C/D – Barra corresponde 20 μm)

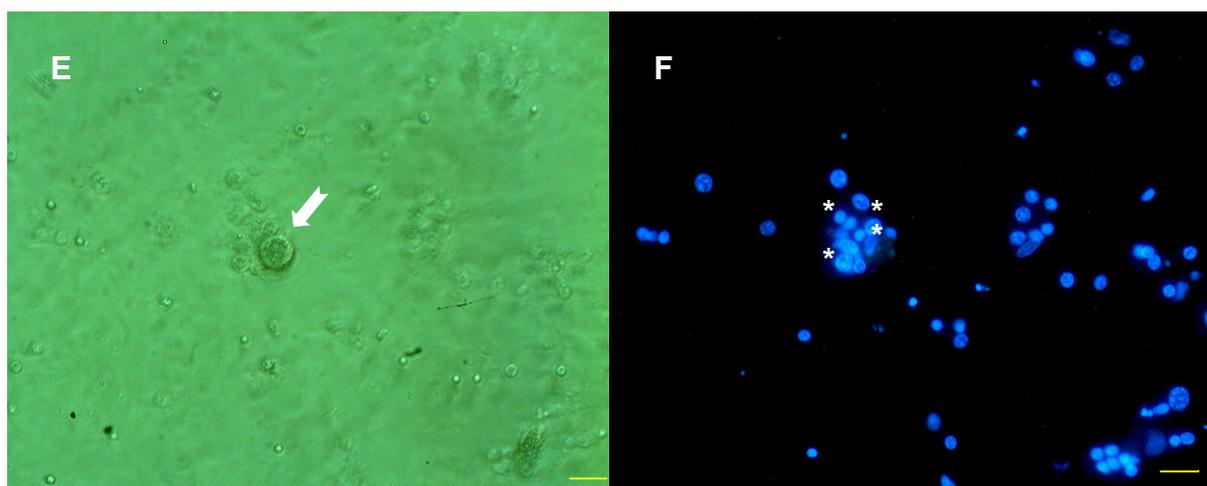


Figura 10 – Classificação de folículos pré-antrais quanto à cobertura de células da granulosa. (E) folículo primordial (seta) em contraste de fase. (F) folículo primordial marcado com Hoechst 33342, totalmente coberto com células da granulosa (*) circundando o ovócito. Microscopia de fluorescência (E/F – Barra corresponde 20 μm)

Diversas pesquisas (felinos: JEWGENOW e STOLTE, 1996; ovinos: CECCONI *et al.*, 1999; caprinos: MACHADO *et al.*, 2002; suínos: KERONG *et al.*, 2007; bovinos: SILVA e LUNA, 2009) empregaram o corante vital azul de Trypan para analisar a viabilidade dos FOPA isolados e/ou cultivados *in vitro*, apesar de Kerong *et al.* (2007) reportarem que o método não proporciona uma análise precisa ao verificar a viabilidade dos folículos isolados. Sendo assim, neste estudo,

utilizamos o marcador fluorescente iodeto de propídeo (Tabela 4), um corante de ácidos nucleicos que não penetra na membrana de células viáveis (Figuras 11 e 12).

Tabela 4 – Classificação de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes avaliados quanto à viabilidade após procedimento mecânico de isolamento.

Total de Folículos Pré-antrais Avaliados	Viáveis (%)	Não Viáveis (%)
556	76,44 (425/556) ^x	23,56 (131/556) ^y

Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente. (^{x,y} P<0,05) Teste de Mann-Whitney.

A taxa de viabilidade, após o isolamento mecânico, foi de 76,44% (P<0,05). Resultados inferiores foram reportados por Jewgenow e Stolte (1996), em felinos não domésticos e Santos *et al.* (2006), com fetos bubalinos, que obtiveram após procedimento mecânico taxas de viabilidade de 50 e 60%, respectivamente. A viabilidade folicular está relacionada com a integridade da membrana basal. Du *et al.* (2006) observaram que grupos de folículos primários que preservaram a integridade da membrana basal após digestão enzimática, apresentaram menores taxas de desnudamento (1,0% versus 38,7%), maior preservação das células da granulosa durante o cultivo (46,7% versus 22,5%) e menor taxa de degeneração de ovócitos (27,9% versus 91,6%). No caso de isolamentos enzimáticos a adição de 5% de soro fetal, como fonte de substrato para a enzima, pode diminuir sua ação deletéria sobre as membranas celulares (NICOSIA *et al.*, 1975).

Segundo Figueiredo *et al.* (1994) a preservação da membrana basal oferece uma série de vantagens, dentre elas, a preservação da morfologia folicular e a manutenção da adesão aos componentes extracelulares. Em recente estudo BRUNO *et al.* (2008), sugeriram correlação positiva entre a concentração de nitrito, produto do metabolismo do óxido nítrico (NO), e a porcentagem de folículos pré-antrais viáveis em cultivo. O NO é um mensageiro intracelular de produção endógena que previne a apoptose de células foliculares e uma das enzimas, a óxido nítrico sintetase indutora, responsável por sua síntese tem sido predominantemente localizada nas células da granulosa de grande parte de folículos antrais imaturos normais (MATSUMI *et al.*, 2000).

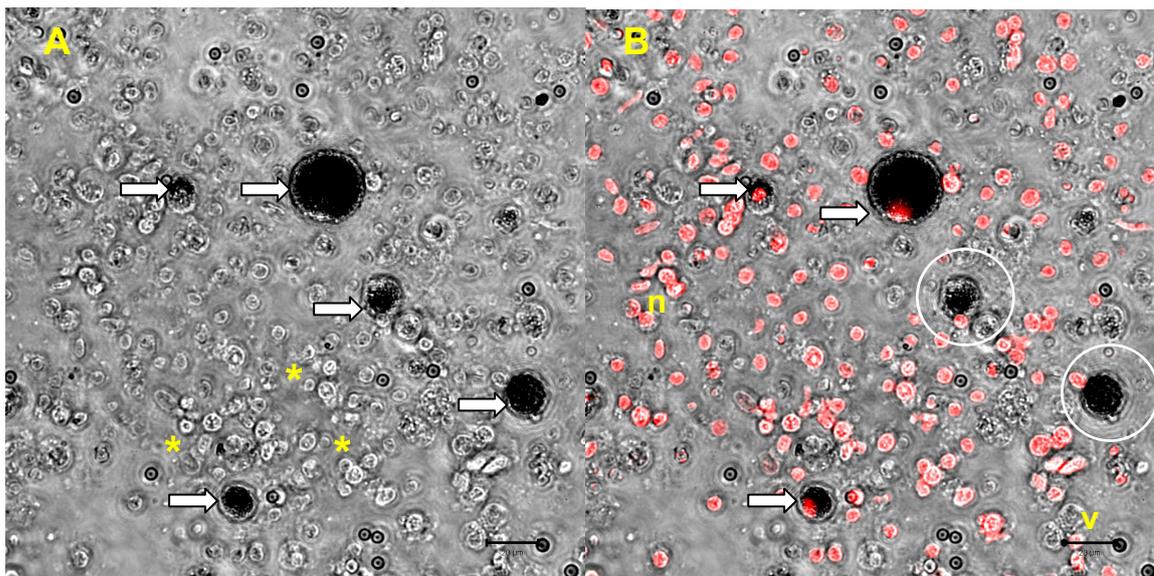


Figura 11 – Avaliação da viabilidade de folículos pré-antrais isolados de fêmeas suínas pré-púberes. (A) Folículos primordiais (seta) e células somáticas dispersas (*) em contraste de fase. (B) Folículos primordiais não viáveis com núcleos marcados com iodeto de propídeo (seta), folículos primordiais viáveis (círculo) e células somáticas viáveis (V) e não viáveis (N). Microscopia confocal (A/B – Barra corresponde 20 μ m).

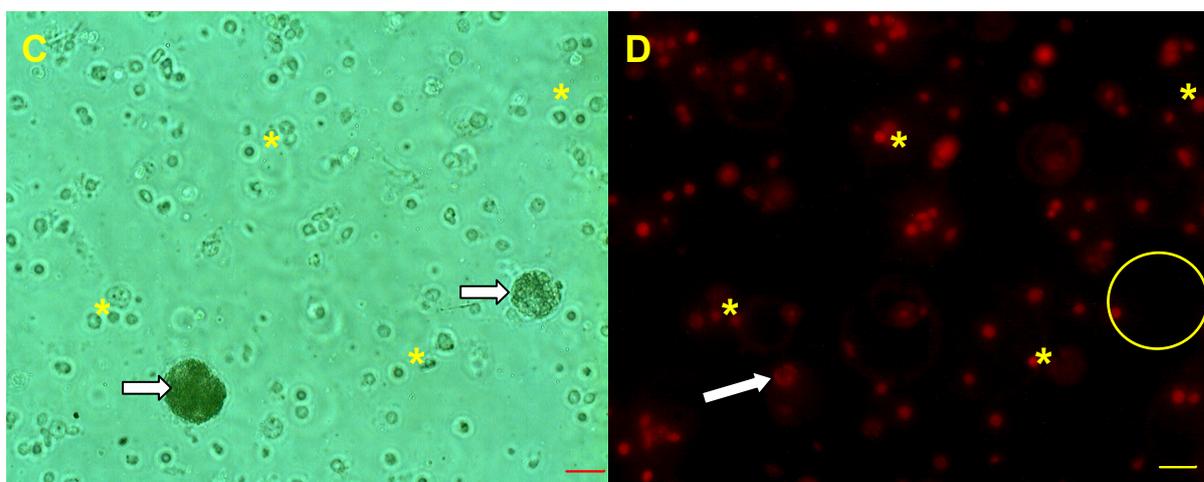


Figura 12 – Avaliação da viabilidade de folículos pré-antrais isolados de fêmeas suínas pré-púberes. (C) Folículos primordiais (seta) e células somáticas dispersas (*) em contraste de fase. (D) Folículo primordial não viável com núcleo marcado pelo iodeto de propídeo (seta), folículo primordial viável não marcado (círculo) e células somáticas dispersas não viáveis (*). Microscopia de fluorescência (C/D – Barra corresponde 20 μ m).

Na avaliação histológica (Figuras 13, 14 e 15) a proporção de folículos primordiais, primários e secundários foi de 89,41%, 2,61% e 7,98%, respectivamente (Tabela 5). Verificou-se um menor percentual de folículos primários em relação aos secundários ($P < 0,05$). Tal fato é justificável pelo critério de avaliação morfológica

adotado (HULSHOF *et al.*, 1994), pois somente eram considerados folículos primordiais aqueles que apresentavam uma camada de células da granulosa de forma cubóide, assim folículos com uma segunda linha incompleta de células da granulosa foram classificados como secundários.

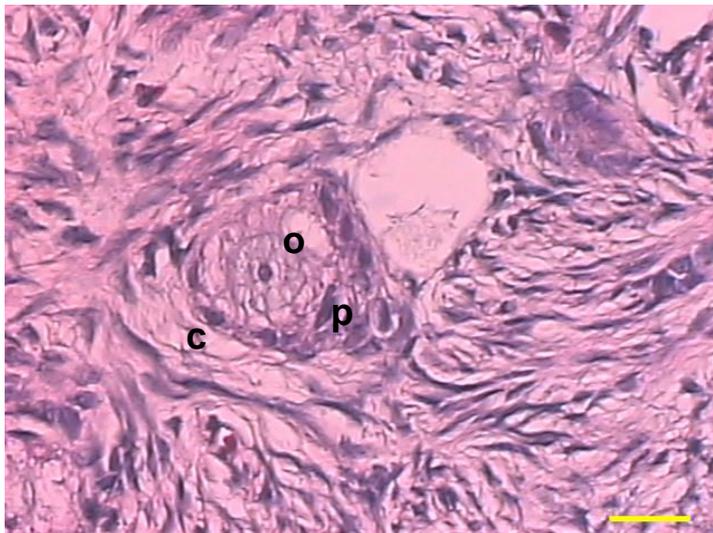


Figura 13 – Corte histológico (HE). Folículo primordial de mãrrã pré-púbere. Ovócito (o) circundado por células da granulosa de forma pavimentosa (p) e cubóide (c). (Barra corresponde a 20 μ m)



Figura 14 – Corte histológico (HE). Folículo primário de mãrrã pré-púbere. Ovócito (o) circundado por uma camada de células da granulosa de forma cubóide (c). (Barra corresponde a 20 μ m)

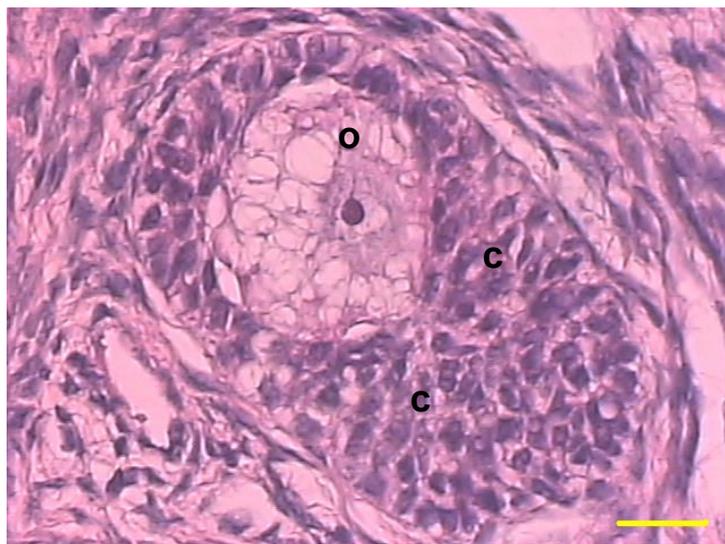


Figura 15 – Corte histológico (HE). Folículo secundário de marrã pré-púbere. Ovócito (o) circundado por mais de uma camada de células da granulosa de forma cubóide (c). (Barra corresponde a 20 μm)

O diâmetro médio dos folículos primordiais, primários e secundários foi de 33,04, 47,59 e 79,113 μm , respectivamente. Telfer (1996) reportou uma variação entre 35 e 100 μm de diâmetro para folículos primordiais e primários de suínos. Lucci *et al.* (1999) observaram valores médios menores de 20,05 e 24,42 μm para folículos primordiais e primários e de 44,24 μm para folículos secundários de caprinos. Essa divergência de valores pode ocorrer devido à diferença entre espécies e por causa do processamento histológico que causa retração de até 25% em tecidos (BANKS, 1991). Contudo, estes dados são importantes para definir qual o intervalo de corte deverá ser adotado antes de se utilizar o procedimento mecânico de isolamento com o tissue chopper, pois de acordo com a secção estabelecida os danos à estrutura folicular podem contribuir para menor viabilidade dos folículos pré-antrais isolados.

O número médio de células da granulosa (Tabela 5) observado nas diferentes classes foliculares foi semelhante aos obtidos por Luna e Munhoz (2008) e Munhoz e Luna (2008) que relataram valores médios de células para os folículos primordiais e primários de 6,35 e 12,15, respectivamente.

Tabela 5 – Morfometria e porcentagem de folículos pré-antrais de fêmeas suínas pré-púberes avaliados histologicamente (média e erro padrão).

Classe Folicular	Ø Diâmetro (µm)			Nº Células Granulosa	População (%)
	Ø Folículo	Ø Ovócito	Ø Núcleo		
Primordial	33,04 ± 1,64 ^x	24,24 ± 1,15 ^x	15,09 ± 0,76 ^x	5,88 ± 0,53 ^x	89,41 ^a
Primário	47,59 ± 2,70 ^y	33,02 ± 1,59 ^y	17,35 ± 1,43 ^{xy}	16,45 ± 1,72 ^y	2,61 ^b
Secundário	79,11 ± 5,75 ^z	41,88 ± 2,51 ^z	19,44 ± 1,01 ^y	46,27 ± 6,58 ^z	7,98 ^c

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05).

^{x,y,z}Teste de Tukey. ^{a,b,c}Teste Mann-Whitney.

Com relação à determinação da população folicular *in situ*, estimada segundo a fórmula proposta por Gougeon e Chainy (1987), o número médio de FOPA isolados histologicamente por ovário foi de 131937,78. A quantidade média de FOPA por ovário recuperado a fresco, após isolamento mecânico de acordo com a metodologia de Lucci *et al.* (2002), foi de 599160,00. Os dois procedimentos apresentaram uma alta taxa de variação individual na contagem de folículos pré-antrais e coeficientes de variação para o procedimento mecânico e a contagem *in situ* de 55,30% e 52,08%, respectivamente. A divergência dos resultados pode ser explicada pela contaminação de células somáticas observadas durante o processamento mecânico do ovário suíno, característica singular desta espécie (GREENWALD e MOOR, 1989; TELFER, 1996). Alguns pesquisadores (JEWGENOW e STOLTE 1996; MACHADO *et al.*, 2002; LUCCI *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2006) observaram este comportamento em outras espécies, que pode ser justificado pela metodologia de isolamento adotada e a fase reprodutiva avaliada.

5. CONCLUSÃO

Folículos pré-antrais, de fêmeas suínas pré-púberes, podem ser isolados mecanicamente.

O número de folículos isolados é influenciado pelo peso ovariano e apresenta alta taxa de variação individual.

O isolamento mecânico mostrou-se eficiente quanto à taxa de recuperação de folículos viáveis, podendo ser utilizados, posteriormente, para o cultivo *in vitro*, apesar de apresentar uma proporção de folículos pré-antrais sem a presença de células da granulosa.

O número de folículos pré-antrais isolados mecanicamente foi diferente do estimado *in situ*, demonstrando que as duas técnicas, na espécie suína, não apresentam correlação quanto ao número total de folículos pré-antrais isolados por ovário.

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.H.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. v.121, p.647-653, 2001.

ALVES, B.G.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E.; FRANCO, J.F.L.; ARAÚJO, V.R.; FAUSTINO, L.R.; ALVES, K.A.; SANTOS, R.M. Isolamento mecânico e quantificação de folículos pré-antrais de suínos em diferentes intervalos de corte. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2009.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; FIGUEIREDO, J.R.; TONIOLLI, R. Efeito da concentração de ácido 3-indol-acético na ativação e crescimento in vitro de folículos pré-antrais ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57, p.334-339, 2005.

AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**. v.37, p.269-277, 2000.

AMORIM, C.A.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, S.H.; GONÇALVES, P.B.; FIGUEIREDO, J.R.; GIORGETTI, A. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. **Theriogenology**. v.60, p.735-742, 2003.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ed. São Paulo: Manole, 1991, p. 565-589.

BASSO, A.C.; ESPER, C.R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.39, p.311-319, 2002.

BASSO, A.C.; GARCIA, J.M.; ESPER, C.R. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo in vitro sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.44, p.134-143, 2007.

BINELLI, M.; PORTELA, V.M.; MURPHY, B.D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2009.

BRUNO, J.B.; LIMA VERDE, I.B.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; LOPES, C.A.P.; MAIA Jr, E.; BÃO, S.N.; NOBRE Jr, H.V.; MAIA, F.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados in vitro na ausência ou presença de soro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.1329-1337, 2008.

BURATINI Jr, J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, p.190-196, 2007.

CARAMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S. Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. v.24, p.235, 1996a.

CARAMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S. Estudos preliminares sobre o resgate de folículos pré-antrais de ovários de fetos ovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. v.24, p.236, 1996b.

CARROL, J.; WHITTINGHAN, D.G.; WOOD, M.J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.93, p.71-79, 1991.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**. v.60, p.594-601, 1999.

CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; CORREIA, J.C.; LIMA VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; BÁO, S.N.; NAME, K.P.O.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**. v.20, p.640-647, 2008.

DANIEL, S.A.J.; ARMSTRONG, D.T.; GORELANGTON, R.E. Growth and development of rat oocytes in vitro. **Gamete Research**. v.24, p.109-121, 1989.

DOMINGUES, S.F.S.; FERREIRA, H.S.; MUNIZ, J.A.P.C.; LIMA, A.K.F.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.3, 2003.

DU, M.; HANG, H.; JIANG, B.; ZHAO, C.; QÍAN, C.; SHEN, H.; XU, Y.; LI, Z. An efficient isolation method for domestic hen (*Gallus domesticus*) ovarian primary follicles. **Journal of Reproduction and Development**. v.52, p.569-576, 2006.

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**. v.49, p.917-932, 1998.

EPPIG, J.J. Growth and development of mammalian oocytes in vitro. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. v.116, p.379-382, 1992.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**. v.54, p.197-207, 1996.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**. v.122, p.829–838, 2001.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F.J.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**. v.40, p.789-799, 1993.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; ECTORS, F.J.; BECKERS, J.F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**. v.41, p.1333-1346, 1994.

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

FIGUEIREDO, J.R. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **O Embrião**. n.44, p.8, Nov/Dez 2009a.

FIGUEIREDO, J.R.; MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2009b.

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

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v.78, p.135-163, 2003.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Editora Varela, 2001, 340p.

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

GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.87, p.561-571, 1989.

GROB, H.S. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. **Science**. v.146, n.3640, p.73-74, 1964.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. **Biology of Reproduction**. v.62, p.1322-1328, 2000.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995, 582p.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; SATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.100, p.333-339, 1994.

HUANMIN, Z.; YONG, Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**. v.54, p.641-650, 2000.

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

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**. v.39, p.527-535, 1993.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**. v.44, p.183-193, 1996.

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-Synthesis of small preantral domestic cat follicle during short-term culture. **Theriogenology**. v.49, p.1567-1577, 1998.

KERONG, S.; XUEFENG, Y.; X.; LIYING, D.; DENGKE, PAN.; YUNHAI, Z.; YONGHUI, Z.; XUEMEI, D.; XIAOXIANG, H.; CHANGXIN, W.; NING, L. Advanced methods of isolation and identification of porcine primordial follicles. **Animal Reproduction Science**. v.101, p.1637-171, 2007.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.R.; FROTA, I.M.A.; SILVA, J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, p.215-224, 2009.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**. v.56, p.223-236, 1999.

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

LUNA, H.S.; MUNHOZ, A.L.R. Morfometria e número de células da granulosa de folículos ovarianos pré-antrais de bovinos (*Bos indicus*) preservados a 4 °C em solução salina por diferentes períodos de tempo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.9, p.01-06, 2008.

MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; BRASIL, A.F.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**. v.12, p.83-91, 2002.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M.F.; McCAULEY, T.C.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro. **Biology Reproduction**. v.67, p.1197-1203, 2002.

MAO, J.; SMITH, M.F.; RUCKER, E.B.; WU, G.M.; McCAULEY, T.C.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. **Journal of Animal Science**. v.82, p.1967-1975, 2004.

MARTINS, F.S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.32, p.36-49, 2008.

MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, p.433-442, 2007.

MATSUMI, H.; YANO, T.; OSUGA, Y.; KUGU, K.; TANG, X.; XU, J.P.; YANO, N.; KURASHIMA, Y.; OGURA, T.; TSUTSUMI, O.; KOJI, T.; ESUMI, H.; TAKETANI, Y. Regulation of Nitric Oxide Synthase to Promote Cytostasis in Ovarian Follicular Development. **Biology of Reproduction**. v.63, p.141-146, 2000.

McNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; FIDLER, A.E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.; TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl.54, p.3-16, 1999.

MOREIRA, F.; PILATI, C.; REIS, R.N.; DICK, W.; SOBESTIANSKY, J. Aspectos macroscópicos dos ovários de matrizes suínas oriundas de granjas da microrregião de Rio Verde – GO e descartadas para abate por motivos diversos. **Archives of Veterinary Science**. v.11, p.47-52, 2006.

MUNHOZ, A.L.R.; LUNA, H.S. Morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos submetidos ao estresse calórico in vitro. **Acta Veterinaria Brasílica**. v.2, p.85-88, 2008.

NICOSIA, S.V.; EVANGELISTA, I.; BATTA, S.K. Rabbit ovarian follicles. Isolation technique and characterization at different stages of development. **Biology of Reproduction**. v.13, p.423-447, 1975.

O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**. v.68, p.1682-1686, 2003.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**. v.55, p.1193-1210, 2001.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D.; BEM, A.R. Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**. v.28, n.3, p.477-482, 1998.

ROY, S.K.; GREENWALD, G.S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. **Biology of Reproduction**. v.32, p.203-215, 1985.

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

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v.63, p.27-39, 2000.

SANTOS, S.S.D.; BIONDI, F.C.; CORDEIRO, M.S.; MIRANDA, M.S.; DANTAS, J.K.; FIGUEIREDO, J.R.; OHASHI, O.M. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Animal Reproduction Science**. v.95, p.1-15, 2006.

SHUTTLEWORTH, G.; PIPKIN, F.B.; HUNTER, M.G. In vitro development of pig preantral follicles cultured in a serum-free medium and the effect of angiotensin II. **Reproduction**. v.123, p.807-818, 2002.

SILVA, V.B.; LUNA, H.S. Viabilidade de folículos pré-antrais bovinos vitrificados em suporte plástico. **Acta Veterinária Brasileira**. v.3, p.16-19, 2009.

TELFER, E.E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. **Theriogenology**. v.45, p.101-110, 1996.

TELFER, E.E. et al. New approaches to increasing oocyte yield from ruminants. **Animal Science**. v.68, p.285-298, 1999.

TELFER, E.E.; BINNIE, J.P.; McCAFFERY, F.H.; CAMPBELL, B.K. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.163, p.117-123, 2000.

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

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

WU, J.; BENJAMIN, R.E.; CARRELL, D.T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**. v.64, p.375-381, 2001.