

ISOLAMENTO MECÂNICO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS EM CABRAS¹

MECHANICAL ISOLATION OF OVARIAN PREANTRAL FOLLICLES IN THE GOAT

Ana Paula Ribeiro Rodrigues² Christiani Andrade Amorim² Carolina Madeira Lucci²
José Ricardo de Figueiredo³ Paulo Bayard Dias Gonçalves⁴ Assis Roberto de Bem⁵

RESUMO

Com o objetivo de isolar mecanicamente folículos pré-antrais caprinos, 52 ovários de cabras sem raça definida (SRD) foram coletados em matadouros ou extraídos por ovariectomia. O protocolo utilizado para o isolamento dos folículos, denominado procedimento mecânico direto (PMD), consistiu no corte do tecido ovariano em pequenos fragmentos, utilizando-se um cortador de tecidos. Em seguida, os fragmentos obtidos foram dissociados mecanicamente com pipetas de pasteur (1600µm e 600µm de diâmetro) e a suspensão resultante, contendo os fragmentos ovarianos, foi sucessivamente filtrada em malhas de náilon (500µm e 100µm). A realização deste procedimento permitiu isolar um número médio (\pm EP) de 1.067 ± 160 folículos por ovário. Com a finalidade de aumentar o número de folículos pré-antrais isolados por ovário, foi utilizado um procedimento mecânico complementar (PMC), que consistiu em submeter os fragmentos retidos nas malhas de 500µm e 100µm às etapas descritas no PMD. A utilização desses fragmentos resultou em um incremento médio de 5,2% no total de folículos isolados por ovário. O número médio (\pm EP) de folículos isolados por ovário, utilizando-se o procedimento mecânico (PMD + PMC), foi 1.126 ± 163 . Independentemente do procedimento utilizado, observou-se uma grande variação individual no número de folículos isolados por ovário. Os limites mínimo e máximo desta variação foram 53 e 7.482 folículos, respectivamente. O tamanho dos folículos isolados variou de 15,0µm a 92,7µm. É viável a utilização do procedimento mecânico, descrito pela primeira vez, para o isolamento de folículos ovarianos pré-antrais caprinos.

Palavras-chave: folículos pré-antrais, isolamento, ovário, caprino.

SUMMARY

For mechanical isolation of caprine preantral follicles, ovaries from 52 undefined breed type goats were collected at a local slaughterhouse or surgically extracted. The method used for preantral follicle isolation was a direct mechanical procedure (DMP). Briefly, ovaries were cut into small fragments using a tissue chopper adjusted to 500µm. The ovarian fragments were suspended 80 times with a pasteur pipette and then, the suspension was filtered successively through 500 and 100µm nylon mesh filters. The DMP resulted in a large number of isolated preantral follicles. On average, $1,067 \pm 160$ (mean number \pm SEM) preantral follicles were isolated per ovary. To increase the number of preantral follicles recovered per ovary, the ovarian fragments remaining in the 500 and 100µm nylon mesh filters were transferred to the tissue chopper, and the procedure was repeated (complementary mechanical procedure - CMP). The use of CMP resulted in a mean increment of 5.2% of the total preantral follicles isolated per ovary. The mean number (mean \pm SEM) of follicles isolated per ovary using the mechanical procedure (DPM + CPM) was $1,126 \pm 163$. Irrespective of the procedure used, the number of preantral follicles isolated was characterized by extreme individual variation. The limits minimum and maximum of this variation were 53 and 7,482, respectively. The diameter of follicles isolated showed a range from 15.0µm to 92.7µm. In conclusion, these results showed, for the first time, that preantral follicles can be successfully isolated from caprine ovary by applying a mechanical procedure.

Key words: preantral follicles, isolation, ovary, caprine.

¹Este trabalho foi implementado com suporte financeiro do CENARGEN/EMBRAPA, Universidade de Liège/Bélgica e FUNCAP/Brasil.

²Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

³Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil, 1700, 60740-000, Fortaleza-CE, Brasil. e-mail: jrf@roadnet.com.br. Autor para correspondência.

⁴Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria - RS.

⁵EMBRAPA/CENARGEN, Brasília - DF (in memoriam).

INTRODUÇÃO

Ao nascimento, o ovário mamífero contém milhares de folículos pré-antrais (CARROLL *et al.*, 1990), constituindo o "pool" de reserva folicular (DOWNS, 1993). No entanto, apenas uma pequena parte (0,01%) pode ser usada durante a vida reprodutiva da fêmea (NUTTINCK *et al.*, 1993), pois a grande maioria desses folículos torna-se atresica durante as fases de crescimento e maturação (CARROLL *et al.*, 1990). Tendo em vista essa grande perda folicular, o isolamento e cultivo de folículos pré-antrais *in vitro* têm sido tema de estudo de muitos pesquisadores em diferentes países do mundo, incluindo o Brasil.

Para o isolamento de folículos pré-antrais, vários protocolos enzimáticos e mecânicos têm sido descritos na literatura. Os procedimentos enzimáticos foram desenvolvidos, basicamente, para animais de laboratório (EPIG, 1976; ROY & GREENWALD, 1985; EPIG & DOWNS, 1987; DANIEL *et al.*, 1989; EPIG & SCHOEDER, 1989; CARROLL *et al.*, 1991; NAYUDU & OSBORN, 1992) e coelho (NICOSIA *et al.*, 1975). Protocolos enzimáticos também foram empregados em ovários de suínos (GREENWALD & MOOR, 1989; LAZZARI *et al.*, 1992; MORBECK *et al.*, 1993), de humanos (ROY & TREACY, 1993) e, mais recentemente, de bovinos e ovinos (CARAMBULA *et al.*, 1996abc). Já os procedimentos mecânicos foram desenvolvidos, principalmente, para o isolamento de folículos pré-antrais de animais domésticos, como a gata (JEWGENOW & PITRA, 1991) e a vaca (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; NUTTINCK *et al.*, 1993; HULSHOF *et al.*, 1994). Estes procedimentos permitiram isolar um grande número de folículos pré-antrais, tanto de animais jovens como de adultos. Embora métodos enzimáticos e mecânicos tenham sido desenvolvidos para isolar folículos pré-antrais em várias espécies de mamíferos, não existem trabalhos na literatura concernentes ao isolamento de folículos pré-antrais caprinos.

Os objetivos do presente estudo foram verificar se os folículos pré-antrais caprinos podem ser isolados mecanicamente *in vitro*, utilizando o procedimento mecânico simples, previamente desenvolvido para isolar folículos pré-antrais bovinos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993) e descrever, com o auxílio de microscópio invertido, as características morfológicas dos folículos pré-antrais caprinos isolados mecanicamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foi utilizado um total de 52 ovários de fêmeas caprinas SRD

oriundas de matadouros locais (cabras de descarte) ou extraídos cirurgicamente no laboratório. Imediatamente após a morte do animal ou ovariectomia, os ovários foram lavados com álcool a 70% por 10 segundos e, em seguida, com solução fisiológica a 0,9%. Após a lavagem, os ovários foram transferidos para recipientes, contendo solução fisiológica a 0,9% a uma temperatura de 37°C e transportados ao laboratório dentro de uma hora.

Os folículos pré-antrais foram isolados, utilizando-se como método de referência o procedimento descrito por FIGUEIREDO *et al.* (1993), modificado. As modificações realizadas no procedimento para isolar folículos pré-antrais caprinos envolveram, basicamente, a não remoção da região medular do ovário, a utilização de pipetas de pasteur de diferentes diâmetros (1600µm e 600µm) e número de aspiração e ejeção da suspensão. O método de isolamento de folículos pré-antrais caprinos, desenvolvido no presente estudo, pode ser dividido em: 1) procedimento mecânico direto (PMD) e 2) procedimento mecânico complementar (PMC).

No procedimento mecânico direto (PMD), os folículos antrais superficiais (FAS) presentes nos ovários foram puncionados para a eliminação do fluido folicular. Em seguida, os ovários foram seccionados com uma lâmina de bisturi, de modo a obter duas porções do ovário não completamente separadas. Após este procedimento, as duas porções de cada ovário, devidamente unidas em uma das bordas, foram seccionadas (sentido córtico-medular) em pequenos fragmentos, utilizando-se o cortador de tecidos (The Mickle Laboratory Engineering CO, Gomshal, Surrey, England) previamente regulado para a realização de cortes seriados em intervalos de 500µm. Para se obter uma fragmentação mais eficiente, o ovário no cortador de tecidos foi umidificado com solução de PBS, acrescido de 5% de soro caprino (PBS⁺) e cortado nos sentidos longitudinal, transversal e oblíquo. Os fragmentos ovarianos obtidos foram dissociados mecanicamente, através de repetidos movimentos de sucção e ejeção, utilizando-se, sucessivamente, pipetas de pasteur calibradas a 1600µm (40 movimentos) e 600µm (40 movimentos) de diâmetro. A suspensão obtida foi sucessivamente filtrada em malhas de náilon de 500µm e 100µm de diâmetro, com a finalidade de separar os folículos pré-antrais isolados dos fragmentos de tecido ovariano com dimensões maiores que 100µm de diâmetro, que ficariam retidos nas malhas. No sentido de se tentar aumentar o número de folículos pré-antrais isolados por ovário, foi realizado o procedimento mecânico complementar (PMC). Para implementar este procedimento, os fragmentos ovarianos que ficaram retidos nas malhas de 500µm e

100µm foram colocados no cortador de tecidos e o procedimento foi repetido.

Os filtrados 1 e 2, oriundos, respectivamente, dos procedimentos mecânico direto e complementar foram colocados, separadamente, em placas de Petri (Steri-Gamma-Plate) e levadas ao microscópio invertido (Zeiss) para a análise dos folículos isolados, a um aumento de 120 vezes. Após o isolamento mecânico, foram quantificados os folículos isolados completamente, bem como aqueles separados incompletamente, circundados por células do estroma ovariano (complexo folículo-estroma - CFE). Para mensuração do diâmetro folicular foi utilizada uma ocular micrométrica acoplada ao microscópio. Após o isolamento, os folículos foram classificados conforme HULSHOF *et al.* (1994) em primordiais, primários e secundários.

O número médio de folículos pré-antrais isolados, bem como o diâmetro folicular médio foram comparados entre si, usando o teste Whitney-Mann, considerando-se que os dados não obedeceram a uma distribuição normal, e o teste-t, respectivamente. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os resultados serão apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média (EP).

RESULTADOS

Os filtrados resultantes dos procedimentos mecânicos direto (PMD) e complementar (PMC) continham células do estroma ovariano, um grande número de folículos pré-antrais intactos, fragmentos de ovário, e uma pequena percentagem de complexo-folículo-estroma - CFE. Do total de folículos presentes nos filtrados, somente 0,8% (9/1.126) se encontraram na forma de CFE.

O número médio de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) isolados nos procedimentos mecânico direto (PMD), complementar (PMC) e total (PMD + PMC) é mostrado na Tabela 1. Foi verificado que do total de folículos isolados 85% (956/1126), 12% (132/1126) e 3% (38/1126) corresponderam aos folículos primordiais, primários e secundários, respectivamente.

No tocante à morfologia, os folículos primordiais continham um oócito claramente visível, circundado por uma camada de células somáticas de forma pavimentosa e/ou cúbica. Os folículos primários eram constituídos por um oócito, circundado por uma camada de células da granulosa somente de forma cúbica. Os folículos secundários apresentavam um oócito circundado por uma ou mais camadas de células da granulosa, também de forma cúbica. Em alguns folículos primários e na maioria dos

folículos secundários, o oócito não foi visualizado devido ao grande número de células da granulosa presente em torno do oócito. Os folículos primordiais, primários e secundários isolados apresentaram um diâmetro médio (\pm EP) de $20,1 \pm 0,5$; $49,7 \pm 0,6$ e $72,7 \pm 1,6\mu\text{m}$, respectivamente. O diâmetro folicular médio foi significativamente ($P < 0,0001$) diferente entre as três classes de folículos estudadas. Considerando as três classes foliculares em conjunto, os folículos presentes nos filtrados mediram em média $38,2 \pm 1,7\mu\text{m}$ de diâmetro, sendo que o menor e o maior tamanho folicular observados foram de 15,0 e 92,7µm de diâmetro, respectivamente.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que um grande número de folículos ovarianos pré-antrais caprinos pode ser isolado, com sucesso, utilizando exclusivamente um procedimento mecânico. A etapa limitante para o estudo dos folículos pré-antrais caprinos *in vitro* é o seu isolamento a partir do ovário. Neste estudo, utilizando-se um procedimento mecânico de isolamento folicular, uma média de 1.126 folículos foram isolados por ovário. Este trabalho mostrou também que a tentativa de se aumentar o número de folículos pré-antrais isolados, submetendo os fragmentos remanescentes nas malhas de 500µm e 100µm à fragmentação no cortador de tecidos, dissociação mecânica e filtração simples (PMC), resultou em um incremento médio de 5,2% no total de folículos isolados por ovário. Neste caso, a utilização do PMC seria recomendada, no futuro, somente no caso de ovários provenientes de animais de elevado padrão genético, ou ainda de animais em risco de extinção, onde a recuperação folicular necessitaria ser otimizada.

Comparando os resultados disponíveis na literatura, concernentes ao isolamento enzimático de folículos ovarianos pré-antrais, pode-se constatar que o número de folículos pré-antrais recuperados por ovário, neste estudo, foi superior ao descrito por ROY & TREACY (1993) em humanos (544 e 760 folículos/ovário provenientes de mulheres de 35 e 16 anos de idade, respectivamente) e ROY & GREENWALD (1985) em hamster (125 folículos/ovário). Ao contrário, os resultados deste estudo foram inferiores aos relatados por GREENWALD & MOOR (1989), utilizando digestão enzimática para o isolamento de folículos pré-antrais em suínos (180.000 folículos/ovário). Apesar da eficiência do procedimento enzimático em isolar folículos pré-antrais mostrada por esses autores, a utilização de enzimas pode representar alguns riscos para o folículo, como por exemplo, danos à membrana basal,

Tabela 1 - Número médio (\pm EP) de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) isolados, utilizando-se o procedimento mecânico direto (PMD), o procedimento mecânico complementar (PMC) e a associação de ambos (PMD+PMC).

Classe folicular	PMD	PMC	PMD + PMC
Primordial	927 \pm 159 ^a (7-6955)	29 \pm 7 ^a (0-238)	956 \pm 161 ^a (7-7156)
Primário	109 \pm 19 ^b (0-742)	23 \pm 6 ^b (0-201)	132 \pm 24 ^b (0-943)
Secundário	31 \pm 5 ^c (0-186)	7 \pm 1 ^b (0-60)	38 \pm 6 ^c (0-212)
Total	1067 \pm 160 (53-7176) (94,8%)*	59 \pm 10 (0-306) (5,2%)*	1126 \pm 163 (53-7482) (100%)*

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (^{a,b,c} P<0,01).

Valores entre parênteses representam a variação individual.

* Porcentagem de folículos isolados.

ruptura das junções entre as células foliculares (NICOSIA *et al.*, 1975) e comprometimento da viabilidade folicular em cultivo (WANDJI *et al.*, 1996). Além disso, ao contrário dos procedimentos mecânicos, a utilização de enzimas para o isolamento de folículos pré-antrais requer um maior controle, principalmente no que concerne ao tempo de exposição do tecido ovariano à enzima (GROB, 1969), à concentração da enzima e ao tipo de tecido submetido ao tratamento enzimático, os quais são fatores que interferem no grau de danos causados pela digestão enzimática (ROY & GREENWALD, 1985).

No tocante aos procedimentos mecânicos de isolamento de folículos ovarianos pré-antrais, vários métodos utilizando diferentes equipamentos como o mixer (JEWGENOW & PITRA, 1991; NUTTINCK *et al.*, 1993), o cortador de tecidos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993) e o fórceps (HULSHOF *et al.*, 1994) foram desenvolvidos, principalmente para ovários de grandes animais. O número de folículos pré-antrais recuperados neste estudo foi superior aos observados em bovinos (JEWGENOW & PITRA, 1991; NUTTINCK *et al.*, 1993 e FIGUEIREDO *et al.*, 1993). JEWGENOW & PITRA (1991) isolaram de 300 a 500 folículos pré-antrais por ovário de vacas. Em outro experimento, também realizado em vacas, uma média de 90 folículos foram isolados por ovário (NUTTINCK *et al.*, 1993). FIGUEIREDO *et al.* (1993) obtiveram uma média de 512 e 298 folículos pré-antrais, a partir de ovários de novilhas e vacas, respectivamente. O resultado inferior ao de caprinos mostrado por estes últimos autores, pode ser devido ao fato de que somente duas classes (primário e secundário) de folículos pré-antrais foram consideradas. Por outro lado,

resultados superiores aos obtidos neste trabalho foram descritos por JEWGENOW & STOLTE (1996) em felídeos domésticos (2.892 folículos/ovário) e não-domésticos (1.867 folículos/ovário), os quais podem ser devido às diferenças existentes entre as espécies, bem como a metodologia empregada no isolamento. FIGUEIREDO *et al.* (1993) e HULSHOF *et al.* (1994) isolaram, respectivamente, uma média de 2.142 e 2.918 folículos por ovário de feto bovino, mostrando

que esses resultados também foram superiores aos observados em caprinos. Essas diferenças podem ser atribuídas ao menor conteúdo fibroso presente no ovário fetal, o que facilitaria o isolamento mecânico dos folículos ovarianos pré-antrais (HULSHOF *et al.*, 1994).

Apesar do grande número de folículos pré-antrais isolados no presente experimento, observou-se uma grande variação individual. Esses resultados são consistentes com as observações de ERICKSON (1966). Baseado em exames histológicos, este autor mostrou que a população folicular no ovário bovino é caracterizada por uma extrema variação individual (0 a 720.000 folículos/ovário). CAHILL *et al.* (1979) mostraram, por meio de estudos histológicos, que a população de folículos ovarianos na ovelha também é marcada por uma grande variação individual. Essas variações se devem ao fato de que a população folicular do ovário mamífero pode ser influenciada por vários fatores como, genético, racial (CAHILL *et al.*, 1979), etário (PETERS, 1976; RÜSSE, 1983) e relativo à espécie (CAHILL *et al.*, 1979) e ao estado reprodutivo do animal (ERICKSON *et al.*, 1976). Variações similares foram verificadas em estudos de isolamento de folículos pré-antrais realizados em bovinos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; NUTTINCK *et al.*, 1993 e HULSHOF *et al.*, 1994) e felídeos (JEWGENOW & GÖRITZ, 1995).

O diâmetro dos folículos pré-antrais caprinos, isolados neste estudo, variou de 15,0 μ m a 92,7 μ m. No tocante ao limite inferior desta variação, dados semelhantes foram encontrados por GREENWALD & MOOR (1989) em porcas (11 μ m de diâmetro). Quanto ao diâmetro do maior folículo isolado em caprinos, este difere daqueles descritos

na literatura, sendo inferior ao observado por ROY & GREENWALD (1985) em hamster (370µm), MORBECK *et al.* (1993) em porcas (300µm) e NUTTINCK *et al.* (1993) em vacas (230µm). Essas diferenças podem ser atribuídas ao uso do filtro de 100µm no processo de isolamento folicular caprino.

Do total de folículos isolados, 85%, 12% e 3% corresponderam aos folículos primordiais, primários e secundários, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com as observações de CARROLL *et al.* (1990; 1991), os quais afirmaram que os folículos primordiais representam a maior parte da população folicular pré-antral existente no ovário mamífero. Entretanto, os resultados do presente trabalho diferem dos observados por HULSHOF *et al.* (1994) em fetos bovinos. Esses autores relataram que do total de folículos isolados, somente 12,4% eram folículos primordiais. No entanto, este resultado pode ser explicado pelo fato de que o tratamento mecânico utilizado por HULSHOF *et al.* (1994) pode não ser adequado para isolar folículos primordiais a partir de fetos bovinos.

Concluindo, este estudo descreve, pela primeira vez, as características morfológicas de folículos pré-antrais caprinos isolados *in vitro*. Além disso, os resultados deste estudo revelam que um grande número de folículos pré-antrais caprinos pode ser isolado, com sucesso, utilizando um procedimento semelhante ao empregado para isolar folículos pré-antrais bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MALÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 55, p. 27-36, 1979.
- CARAMBULA, S.F., GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, (supl.), p. 235, 1996.
- CARAMBULA, S.F., GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Estudos preliminares sobre resgate de folículos pré-antrais de ovários de fetos ovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, (supl.), p. 236, 1996b.
- CARAMBULA, S.F., GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Influência da idade fetal no isolamento de folículos pré-antrais em diferentes estágios de desenvolvimento folicular em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, (supl.), p. 237, 1996c.
- CARROLL, J., WHITTINGHAM, D.G., WOOD, M.J. *et al.* Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 90, p. 321-327, 1990.
- CARROLL, J., WHITTINGHAM, D.G., WOOD, M.J. Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 92, p. 197-207, 1991.
- DANIEL, S.A.J., ARMSTRONG, D.T., GORE-LANGTON, R.E. Growth and development of rat oocytes in vitro. **Gamete Research**, v. 24, p. 109-121, 1989.
- DOWNS, S.M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 65-79, 1993.
- EPPIG, J.J. Analysis of mouse oogenesis in vitro. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. **J. Exp. Zool.**, v. 198, p. 375-382, 1976.
- EPPIG, J.J., DOWNS, S.M. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. **Developmental Biology**, v. 119, p. 313-321, 1987.
- EPPIG, J.J., SCHOEDER, A.C. Capacity of mouse oocyte from preantral follicles undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 268-276, 1989.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**, v. 25, p. 800-805, 1966.
- ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A., MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 555-560, 1976.
- FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R. *et al.* Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789-799, 1993.
- GREENWALD, G.S., MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 87, p. 561-571, 1989.
- GROB, H.S. Growth and endocrine function of isolated ovarian follicles cultured in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 320-323, 1969.
- HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.B. *et al.* Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Quarterly Journal of Veterinary Science**, v. 16, p. 78-80, 1994.
- JEWGENOW, K., PITRA, C.A. Method for isolation of preantral follicles from cattle ovaries. **Reproduction Domestic Animals**, v. 26, p. 281-289, 1991.
- JEWGENOW, K., GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. **Reproduction Domestic Animals**, v. 39, p. 285-297, 1995.
- JEWGENOW, K., STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 183-193, 1996.

- LAZZARI, G., GALLI, C., MOOR, R.M. Centrifugal elutriation of porcine oocytes isolated from the ovaries of newborn piglets. **Analytical Biochemistry**, v. 200, p. 31-35, 1992.
- MORBECK, D.E., FLOWERS, W.L., BRITT, J.H. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 99, p. 577-584, 1993.
- NAYUDU, P.L. & OSBORN, S.M.. Factors influencing the rate of preantral growth of mouse ovarian follicles in vitro. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 95, p. 349-362, 1992.
- NICOSIA, S.V., EVANGELISTA, I., BATA, S.K. Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. **Biology of Reproduction**, v. 13, p. 423-447, 1975.
- NUTTINCK, F., MERMILLOD, P.M., DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993.
- PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v. 16, p. 271-278, 1976.
- 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. 783-791, 1993.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.
- WANDJI, S.A., SRSEN, V., VOSS, A.K., *et al.* 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.

Ciência Rural, v. 28, n. 3, 1998.