

INES CRISTINA GIOMETTI

**CULTIVO DE FOLÍCULOS
PRÉ-ANTRAIS**

Botucatu

2003

INES CRISTINA GIOMETTI

CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

Monografia apresentada à disciplina Seminários II, do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

Docentes responsáveis :

Profa. Dra. Maria Denise Lopes e Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Botucatu

2 0 0 3

SUMÁRIO

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	04
2. INTRODUÇÃO.....	05
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3.1. Classificação dos folículos ovarianos.....	06
3.2. Folículos primordiais.....	07
3.3. Folículos primários.....	08
3.4. Folículos secundários.....	09
3.5. Técnicas de Isolamento folicular.....	10
3.6. Cultivo de folículos pré-antrais.....	13
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
5. REFERÊNCIAS.....	17

1. LISTA DE ABREVIATURAS

CGs = células da granulosa

DNase = desoxirribonuclease

EGF = fator de crescimento epidermal

FGF = fator de crescimento fibroblástico básico

FSH = hormônio folículo estimulante

GDF-9 = fator de crescimento de diferenciação 9

µm = micrômetros

mm = milímetros

MOIFOPA = Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais

O₂ = oxigênio

SOF = meio sintético de fluído de oviduto

TZPs = projeções transzonais

ZP = zona pelúcida

LH = Hormônio luteinizante

2. INTRODUÇÃO

Os humanos e os animais domésticos nascem com centenas de milhares de oócitos, dos quais somente uma ínfima parte atinge o estágio de maturação meiótica. A colheita destes oócitos somente a partir de folículos antrais limita o número de nascimentos, assim como a exploração do material genético de cada animal (EPPIG & O'BRIEN, 1998; CECCONI *et al.*, 1999). Sendo assim, a recuperação de oócitos a partir de folículos pré-antrais, seguido do seu crescimento *in vitro*, tem importantes aplicações, pois, além de um aumento significativo na população de animais geneticamente superiores, promove uma redução no intervalo entre gerações. Evita ainda, a exposição do oócito às variações ambientais as quais está sujeito no ovário adulto, além de exercer importante função como modelo nas investigações dos complexos mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial. Em adição, esta técnica tem um grande impacto na reprodução assistida de espécies em extinção e também de humanos. As possibilidades do emprego dos folículos pré-antrais em sistemas de crescimento, maturação e fecundação *in vitro* abre um leque de novas alternativas para a seleção e melhoramento genético animal.

Em roedores, os sistemas de cultivo de folículos pré-antrais têm tido êxito na produção de grande número de oócitos meioticamente competentes, inclusive com a obtenção de nascimentos (EPPIG & SCHROEDER, 1989). O tempo requerido para o cultivo de folículos pré-antrais de camundongos para desenvolver a folículo de Graaf é de apenas 6 dias (BOLAND *et al.*, 1993). No entanto, em humanos e animais domésticos, o desenvolvimento folicular *in vivo* é um processo muito lento, levando até seis meses desde o início do crescimento folicular até formação de um folículo pré-ovulatório (LUSSIER *et al.*, 1987). Nesses casos, sistemas de cultivo vêm sendo testados a fim de atingir um modelo de desenvolvimento folicular que mantenha a integridade do oócito e sua capacidade de ser ovulado e fecundado *in vitro*. A evolução destas pesquisas requer um completo entendimento da biologia celular na fase de desenvolvimento do folículo, como também o estabelecimento de sistemas eficientes de isolamento e cultivo *in vitro* que suportem o crescimento folicular até o estágio de maturação meiótica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O “pool” de folículos pré-antrais existente nos ovários de mamíferos representa uma significativa reserva de material para estudos com a manipulação genética de espécies domésticas, bem como para a preservação de espécies em extinção e tratamento de algumas formas de infertilidade (PICTON, 2001).

O cultivo de folículos pré-antrais de roedores *in vitro* leva à formação de antro, ao desenvolvimento do oócito, à ovulação *in vitro* e ao nascimento da progênie. Mas não se obtém o mesmo sucesso com essa técnica em humanos e animais domésticos. Somente recentemente, conseguiu-se desenvolver os folículos pré-antrais de bovinos até o estágio com formação de antro com folículos pré-antrais com mais de 166 µm de diâmetro cultivados por 28 dias (GUTIERREZ *et al.*, 2000).

3.1. Classificação dos folículos ovarianos

Os folículos ovarianos pré-antrais são classificados de acordo com: a) o tamanho, pela medida do diâmetro folicular; b) o grau de evolução, observando-se o número de camadas de células da granulosa (CGs); e c) a viabilidade, como normais ou atrésicos.

A classificação dos folículos pré-antrais foi proposta há meio século, quando Mandl & Zuckerman (1951) caracterizaram os folículos em estádios de acordo com o número de camadas de CGs ao redor do oócito: 1, oócito rodeado por uma camada simples de CGs achatadas; 2, oócito em crescimento rodeado por uma camada simples de CGs cuboidais; 3, oócito em crescimento rodeado por duas camadas de CGs cuboidais; 4, oócito em crescimento rodeado por três camadas de CGs cuboidais; 5, oócito em crescimento rodeado por quatro ou mais camadas de CGs cuboidais, mas sem cavidade antral.

Hulshof *et al.* (1994) classificaram os folículos pré-antrais em primordiais, primários e secundários, estabelecendo que os folículos primordiais e primários não poderiam ser distinguidos pelo diâmetro, mas sim, por diferenças morfológicas. Segundo este estudo, os folículos primordiais apresentavam um oócito rodeado por uma camada de 4 a 8 CGs achatadas, os primários mostravam um oócito rodeado por uma camada de 11 a 12 CGs cuboidais e os secundários, mais de uma camada

de CGs cuboidais. Os folículos pré-antrais podem também ser classificados em primordial inativo, primordial ativado, primário e secundário (FAIR *et al.*, 1997).

Os folículos pré-antrais foram classificados também de acordo com o seu grau de viabilidade em: folículos saudáveis (com lâmina basal intacta, oócito com não mais de 3 vacúolos citoplasmáticos, vesícula germinativa e nucléolo intactos), folículos em atresia inicial (estádio I: oócito com mais de 3 vacúolos citoplasmáticos e em início de descondensação da cromatina), folículos em atresia moderada (estádio II: oócito com nucléolo e citoplasma em fragmentação e alta condensação da cromatina) ou folículos com atresia acentuada (estádio III: oócito completamente fragmentado ou ausente; BUTLER, 1970; WANDJI *et al.*, 1996).

Independente da espécie ou terminologia utilizada para as classificações de folículos pré-antrais na literatura, os folículos primordiais se caracterizam por poucas CGs achatadas ao redor do oócito, enquanto os folículos primários são caracterizados por oócitos rodeados por uma camada completa de CGs cuboidais (VAN DEN HURK *et al.*, 1998; PICTON, 2001).

Em geral, a ultraestrutura de folículos pré-antrais bovinos (FAIR *et al.*, 1997; HYTTEL *et al.*, 1997) é semelhante à de outras espécies de mamíferos, como caprinos (LUCCI *et al.*, 2001), suínos (GREENWALD & MOOR, 1989), felinos (JEWGENOW & STOLTE, 1996) ou humanos (OKTAY *et al.*, 1997). Algumas diferenças são observadas entre as diferentes espécies e ao longo das diferentes fases do desenvolvimento folicular.

O diâmetro dos oócitos e dos folículos pré-antrais de ovinos (LUNDY *et al.*, 1999) e bovinos (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997; HYTTEL *et al.*, 1997) é maior do que de caprinos (LUCCI *et al.*, 2001), que é similar ao observado em humanos (LINTERN-MOORE *et al.*, 1974). Entretanto, a forma e a extensão no número de células da granulosa vista de um corte equatorial descritos são semelhantes em ovelhas (LUNDY *et al.*, 1999), vacas (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), cabras (LUCCI *et al.*, 2001) e mulheres (LINTERN-MOORE *et al.*, 1974).

3.2. Folículos primordiais

O folículo primordial representa o estágio a partir do qual os folículos são recrutados para o crescimento e, na maioria dos mamíferos, o número de estruturas

é determinado ao nascimento (TELFER *et al.*, 2000). Cada folículo primordial apresenta um oócito rodeado por uma camada de células da granulosa (CGs) achatadas, envolta por uma membrana basal. O diâmetro do folículo primordial bovino varia de 30 a 40 μm , enquanto seu oócito, entre 20 e 25 μm (BECKERS *et al.*, 1996).

Nos folículos primordiais, um grande núcleo do oócito ocupa uma posição central demonstrando um nucleolo evidente. As organelas são uniformemente distribuídas no citoplasma ou bem próximas ao núcleo. A mitocôndria é a organela mais evidente e é predominantemente redonda, o retículo endoplasmático liso e o Complexo de Golgi são pouco desenvolvidos e várias vesículas estão espalhadas pelo citoplasma (LUCCI *et al.*, 2001).

Quando a população de folículos primordiais é estabelecida, grupos de folículos, gradualmente e sucessivamente saem do “pool” bloqueado e entram em fase de crescimento. Ainda são desconhecidos os fatores que determinam a origem do crescimento folicular (também conhecida como ativação folicular), a diferenciação e acúmulo de organelas citoplasmáticas e a seleção de alguns folículos primordiais, enquanto outros permanecem bloqueados (FORTUNE *et al.*, 2000). Apesar dos mecanismos envolvidos na ativação do folículo primordial, para crescimento ou atresia, ainda serem desconhecidos, eles representam uma importante linha de pesquisa da biologia ovariana (JEWGENOW & GÖRITZ, 1995). O folículo primordial bovino leva presumivelmente 100 dias para atingir o estágio pré-ovulatório (BRITT, 1991).

3.3. Folículos primários

A evolução do crescimento dos folículos pré-antrais estaria relacionada ao aumento do diâmetro do oócito, bem como a proliferação das CGs (FIGUEIREDO *et al.*, 1994). A atividade de proliferação das CGs resulta na formação de uma camada de células cuboidais ao redor do oócito que caracterizam o folículo primário. As CGs não só se tornam mais volumosas como também se multiplicam por mitoses a partir deste estágio. No bovino, o folículo primário possui um diâmetro de 40 a 60 μm , com um oócito de 30 a 40 μm (BECKERS *et al.*, 1996).

A zona pelúcida (ZP) aparece primeiramente ao redor do oócito de folículo

primário, como ilhas de material fibrilar situadas em espaços entre as CGs adjacentes e a superfície do oócito. Através de análise radioautográfica da biossíntese e renovação de glicoproteínas do folículo em desenvolvimento, observou-se que a ZP resulta exclusivamente da atividade secretória do oócito (HADDAD & NAGAI, 1977, WOLGEMUTH *et al.*, 1984). No folículo primordial e primário, as comunicações entre as CGs e o oócito são mediadas por endocitose, sinalizadas pelas numerosas invaginações e vesículas (HYTTEL *et al.*, 1997; ALBERTINI *et al.*, 2001).

Assim como nos folículos primordiais, o citoplasma dos oócitos dos folículos primários também contém numerosas mitocôndrias redondas, além das usuais organelas. Conforme o folículo se desenvolve a mitocôndria vai tornando-se alongada (LUCCI *et al.*, 2001).

3.4. Folículos secundários

Quando os folículos atingem um estágio com mais de duas camadas de CGs cuboidais é, então, denominado secundário. O folículo secundário atinge de 60 a 200 μm de diâmetro em vacas (BECKERS *et al.*, 1996). Durante, a fase de crescimento do folículo secundário, fibras de tecido conectivo se posicionam paralelamente à membrana basal para formar a camada tecal.

No folículo secundário, o tipo de interação entre as CGs e entre as CGs e o oócito passa a ser realizado também por “Gap junctions”. À medida que o oócito aumenta de diâmetro, a ZP evolui para uma fina camada que aumenta com o desenvolvimento folicular, tornando-se densa e com filamentos interconectados ao redor do oócito, separando-o das CGs. A comunicação entre o oócito e as CGs é mantida por projeções transzonais (TZPs), que foram caracterizadas em folículos pré-antrais de mamíferos como extensões das CGs que atravessam a ZP e terminavam sobre a superfície do oócito (HERTING & ADAMS, 1967). Foi demonstrado que as TZPs sofriam alterações dinâmicas durante as diferentes fases do desenvolvimento folicular (MOTTA *et al.*, 1994) e serviam para modular informações entre o oócito e as CGs. Após a formação do antro, estas projeções se retraíam e mantinham-se como pequenas conexões terminais. Nuttinck *et al.* (1993) observaram que nenhum folículo apresentou antro até que atingisse 115 a 280 μm

de diâmetro.

Com base em diferentes estudos sobre as comunicações entre o oócito e as CGs, Albertini *et al.* (2001) propuseram um modelo explicativo no qual o transporte de diferentes fatores de crescimento e hormônios entre as CGs e o oócito seria realizado por vesículas de endocitose em regiões de contato entre a ZP e a célula da granulosa e por junções tipo Gap entre os microvilos do oócito e as TZPs das CGs. Concluíram ser de fundamental importância que os sistemas de manipulação *in vitro* de folículos pré-antrais mantivessem intactas as comunicações entre as células foliculares e o oócito, no sentido de preservar sua integridade estrutural.

HYTTEL *et al.* (1997) demonstraram que o núcleo do oócito passa de uma posição central no oolema dos folículos primordiais para uma região excêntrica no folículo secundário, ou seja, situado na região entre a zona pelúcida e o centro do oócito. As organelas também se movem e no folículo secundário se encontram mais próximas à periferia. O retículo endoplasmático liso aumenta de tamanho no folículo secundário e a vasta maioria das mitocôndrias são alongadas (LUCCI *et al.*, 2001).

3.5. Técnicas de Isolamento folicular

O primeiro passo para a execução da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) foi definir a melhor metodologia de isolamento dos folículos de forma a se obter o maior número, com a melhor viabilidade possível, para então se proceder as técnicas de crescimento e cultivo *in vitro* (TELFER, 1996). Isolar folículos pré-antrais de animais domésticos adultos é mais difícil do que de roedores, já que os ovários são mais fibrosos por natureza (GUPTA *et al.*, 2002). Apesar disso, grandes avanços na pesquisa sobre folículos pré-antrais ocorreram em diferentes espécies de mamíferos, definindo-se a melhor metodologia de isolamento.

Existem basicamente três tipos de isolamento de folículos pré-antrais: isolamento mecânico (EPPIG & SCHROEDER, 1989; EPPIG & TELFER, 1993; FIGUEIREDO *et al.*, 1993; HULSHOF *et al.*, 1994; EPPIG & O'BRIEN, 1996; WANDJI *et al.*, 1996); digestão proteolítica pelo uso de enzimas (GREENWALD & MOOR, 1989; FIGUEIREDO *et al.*, 1993; DURRANT *et al.*, 1998); ou isolamento mecânico em combinação com dissociação enzimática parcial (FIGUEIREDO *et al.*,

1993, OKTAY *et al.*, 1997).

Nos procedimentos mecânicos, a fragmentação da estrutura do estroma ovariano pode ser feita através de diferentes instrumentos para promover o isolamento de folículos pré-antrais. Os primeiros relatos com isolamento desses folículos foram descritos utilizando agulhas ultra-finas para dissociar ovários de camundongo (TORRANCE *et al.*, 1989) e de felinos (JEWGENOW & PITRA, 1993; JEWGENOW, 1996). Outros autores também relataram o uso de bisturis, pinças e pipetas de Pasteur (HIRAO *et al.*, 1990), para promover a fragmentação do tecido ovariano.

Com relação aos bovinos, porções de tecido ovariano têm sido processadas no “Tissue Chopper” , seguido de sucessivas pipetagens (FIGUEIREDO *et al.*, 1993). O procedimento consiste de uma fragmentação do tecido ovariano, utilizando o “Tissue Chopper” com intervalos entre cortes de 500 µm, depois repedidas pipetagens com pipetas pasteur de 1000 µm e 500 µm. Com este procedimento mecânico, folículos primários e muitos folículos secundários puderem ser isolados. O método mecânico utilizando o “Tissue Chopper” para o isolamento de folículos pré-antrais tem proporcionado a recuperação de um grande número de folículos pré-antrais com baixa porcentagem de oócitos desnudos (menor ruptura dos folículos), graças à preservação da membrana basal (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; GOSDEN & TELFER, 1987). Porém, apesar dos folículos parecerem normais morfológicamente após o isolamento mecânico, a porcentagem de folículos viáveis pela coloração com “Trypan Blue” é de somente 77% (GUPTA *et al.*, 2002).

Carámbula *et al.* (1996) isolaram folículos pré-antrais de fetos bovinos, utilizando uma tesoura cirúrgica realizaram cortes sucessivos dentro de um tubo de centrífuga, fragmentando os ovários de maneira uniforme. Além de diminuir o custo de implantação do sistema, o método foi mais eficiente que o “Tissue Chopper” quanto ao número de folículos recuperados e tornou o processo mais rápido que o sistema tradicional.

Basso (2001) isolou em média 326 folículos pré-antrais de ovário feto bovino e em média 178 folículos pré-antrais de vaca adulta utilizando o método mecânico. O isolamento de folículos pré-antrais de bubalinos através do aparelho “Tissue Chopper” , resultou em menor número de folículos que em bovinos (GUPTA *et al.*, 2002), isso pode ser devido a uma menor quantidade de células germinativas em

ovários de búfalos (PALTA & CHAUHAN, 1998).

No que se refere ao tratamento enzimático, existem muitas considerações a respeito do efeito de enzimas como a tripsina, pronase e colagenase, na viabilidade dos folículos isolados no que concerne à degradação da membrana basal, podendo resultar em separação das células da granulosa e a desnudação do oócito (TELFER *et al.*, 1999). No entanto, a colagenase tem se mostrado mais eficiente e menos deletéria aos oócitos, apesar dos folículos ficarem desprovidos das células da teca e constituírem um complexo de CGs-oócito sob uma membrana basal parcialmente degradada (BUCCIONE *et al.*, 1990). Se a integridade do folículo é baixa, assim será o seu potencial de desenvolvimento. Apesar disso, esta técnica de dissociação enzimática pela colagenase resultou em grande número de folículos pré-antrais a partir de ovários de camundongos (TORRANCE *et al.*, 1989) e a colagenase associada à DNase, por 1 hora a 37°C, não causou danos morfológicos aos folículos pré-antrais de humanos (ROY & TREACY, 1993) e de cães (BOLAMBA *et al.*, 2002). A técnica utilizada por BOLAMBA *et al.* (2002) foi seguida por filtração em membrana de nylon de 35 mm.

A combinação entre a dissociação enzimática com colagenase e a dissecação mecânica proporcionou a recuperação de maior número de folículos em relação ao método mecânico simples em vacas (FIGUEIREDO *et al.*, 1993). O método enzimático rende mais que cinco vezes o número de folículos pré-antrais que o método mecânico em bubalinos (GUPTA *et al.*, 2000). Entretanto, tanto em bovinos quanto em bubalinos, utiliza-se o isolamento mecânico para eliminar possíveis efeitos deletérios na viabilidade do oócito pelo tratamento enzimático (GUPTA *et al.*, 2002). Wandji *et al.* (1996) afirmaram que o isolamento por dissociação enzimática de folículos não se mostrou ideal para a sobrevivência dos oócitos bovinos, indicando que fragmentos isolados mecanicamente do córtex ovariano sobreviviam melhor no mesmo meio de cultivo.

No que se refere a outras espécies de animais, os estudos acerca do isolamento folicular têm mostrado resultados satisfatórios. Em suínos, a dissociação enzimática utilizando colagenase resultou na obtenção de 185.000 folículos pré-antrais (GREENWALD & MOOR, 1989). JEWGENOW & GÖRITZ (1995) isolaram 2.892 folículos de ovários de gata adulta com o uso de filtros de dissociação e JEWGENOW & STOLTE (1996) isolaram 1.867 folículos de felinos selvagens pelo

mesmo método.

3.6. Cultivo de folículos pré-antrais

O desenvolvimento de um sistema *in vitro* que suporte o crescimento do folículo pré-antral nas espécies domésticas é ambicioso, porque o desenvolvimento nas espécies domésticas ocorre em um tempo muito mais longo comparando com animais de laboratório e além disso, os folículos pré-antrais têm que crescerem muito mais até tornarem-se pré-ovulatórios. Enquanto um folículo de camundongo tem que crescer em torno de 400 μm *in vitro*, o folículo pré-antral de bovinos tem que crescer aproximadamente 8 mm (TELFER *et al.*, 2000).

Os primeiros folículos pré-antrais e serem cultivados foram isolados a partir de ovários de hamster. Os folículos foram cultivados em grupo sobre uma monocamada de gel de ágar para prevenir a adesão dos folículos à superfície do plástico e posteriormente foram cobertos com meio de cultivo. A sobrevivência dos folículos, bem como a aquisição de sítios de ligação para LH nas células da granulosa parecem estar correlacionados com a presença de insulina no meio de cultivo. Além disso, a taxa de divisão celular aumenta em função da adição do soro sanguíneo ao meio (ROY & GREENWALD, 1989).

Os sistemas de cultivo de folículos pré-antrais de suínos são mais avançados que nas outras espécies de grandes animais. Os oócitos de folículos pré-antrais de suínos são desenvolvidos com uma matriz de gel de colágeno e se tornam competente meioticamente se atingem um diâmetro de ao menos 100 μm (HIRAO *et al.*, 1994).

Ocorre um maior grau de crescimento no começo do cultivo e esse crescimento vai diminuindo com o tempo de cultivo em todas as classes de folículos pré-antrais (GUPTA *et al.*, 2002). Folículos pré-antrais grandes de bovinos tiveram um maior crescimento *in vitro* do que folículos pré-antrais menores (KATSKA & RYNSKA, 1998). Telfer *et al.* (1999) também observaram maior crescimento em folículos pré-antrais grandes (170 μm) que em pequenos (40-90 μm). Entretanto, em búfalos, a classe de folículos pré-antrais que teve maior crescimento *in vitro* foi entre 37 e 90 μm , folículos maiores e menores que isso, tiveram um menor desenvolvimento (GUPTA *et al.*, 2002).

As gonadotrofinas exógenas, como o FSH, e diversos fatores de crescimento têm demonstrado atuar positivamente no crescimento de folículos pré-antrais em cultivo *in vitro* em diferentes espécies (WANDJI *et al.*, 1996a; GUPTA *et al.*, 2002). O FSH é conhecido por estimular o crescimento folicular e manter a integridade das células da granulosa em suínos (HIRAO *et al.*, 1994), ovinos (CECCONI *et al.*, 1999), humanos (ROY & TREACY, 1993) e bovinos (SAHA *et al.*, 2000). As gonadotrofinas também estimulam a esteroidogênese (ROY & TREACY, 1993; CECCONI *et al.*, 1999).

Dados conflitantes têm sido apresentados no que se refere ao FSH no meio de cultivo de folículos pré-antrais bovinos, Braw-Tal & Yossefi (1997) relataram que o FSH não tem nenhum efeito no crescimento de folículos bovinos *in vitro*. Porém, Nuttinck *et al.* (1996) afirmaram que o FSH induz a degeneração de oócitos em folículos pré-antrais cultivados e sua degeneração foi atenuada por fatores de crescimento fibroblásticos. Esses dados diferem de outros pesquisadores que observaram um efeito positivo do FSH nos meios de cultivo, como em ovelhas (CECCONI *et al.*, 1999), humanos (ROY & TREACY, 1993) e em búfalos (GUPTA *et al.*, 2002).

A insulina no meio de cultivo promove o crescimento das células da granulosa (FIGUEIREDO *et al.*, 1994; GUTIERREZ *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2002). O soro fetal bovino, adicionado ao meio, melhora a porcentagem de folículos pré-antrais em crescimento em longos tempos de cultivo de folículos de suínos (TELFER *et al.*, 2000). Porém em bovinos, não é necessário soro para o folículo pré-antral atingir o estágio antral de desenvolvimento (ITOH *et al.*, 2002).

A concentração de oxigênio é outro importante parâmetro para determinar as condições de cultivo dos folículos pré-antrais. Entretanto, o efeito exercido por altas ou baixas concentrações de gás O₂ são ainda controversas. Eppig & Wligglesworth (1995) reportaram que em 5% de O₂ a competência do oócito para se desenvolver foi promovida e Cecconi *et al.* (1999) também obtiveram melhores resultados de crescimento folicular em 5% do que em 20% de O₂. Porém, Smitz *et al.* (1996) observaram um menor grau de crescimento dos folículos cultivados *in vitro* quando utilizando 5% de O₂.

A formação de antro nos folículos pré-antrais grandes em cultivo *in vitro* foi conseguida em suínos (HIRAO *et al.*, 1994), ovinos (CECCONI *et al.*, 1999),

caprinos (HUANMIN & YONG, 2000), humanos (ROY & TREACY, 1993) e bovinos (GUTIERREZ *et al.*, 2000, ITOH *et al.*, 2002). Em búfalos, mesmo com 40 dias de cultivo, não foi possível observar a formação de antro (GUPTA *et al.*, 2002).

Sistemas de cultivo para folículos pré-antrais bovinos não têm sido um sucesso no que se refere a produzir oócitos meioticamente competentes (TELFER, 1996), mas um pequeno número de oócitos de folículos ovinos crescidos *in vitro* têm atingido o estágio de metáfase II (CECCONI *et al.*, 1999). Em caninos, foi possível atingir o estágio de metáfase II em oócitos de folículos pré-antrais maturados em meio SOF, acrescido de soro ou albumina sérica bovina (BOLAMBA *et al.*, 2002).

Em suínos, Wu *et al.* (2001) conseguiram cultivar folículos pré-antrais em meio acrescido de soro suíno e FSH até o estágio antral de desenvolvimento, conseguindo alguns oócitos em metáfase II que foram fertilizados, obtendo alguns blastocistos. O método de isolamento utilizado neste experimento foi o mecânico. Com a obtenção de desenvolvimento embrionário a partir de folículos pré-antrais de suínos, novas perspectivas são geradas em relação a técnica de MOIFOPA em outras espécies de animais domésticos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) é de grande importância tanto para a pesquisa fundamental, por contribuir para a elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese nesta fase, quanto para a reprodução animal, possibilitando o isolamento de milhares de folículos a partir de um único ovário e o posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles contidos, até o estágio de maturação e fertilização.

O maior obstáculo para desenvolver a técnica de MOIFOPA para espécies com um longo período de crescimento é o nosso quase completo desconhecimento dos estádios iniciais de desenvolvimento folicular. Para que ocorra avanços nessa biotecnologia nós necessitamos de marcadores moleculares celulares de diferenciação das células somáticas e do oócito, capazes de correlacioná-los com o desenvolvimento normal *in vivo*. Há vários marcadores candidatos, como os fatores de crescimento intra-ovarianos (IGFs, FGFs, EGFs, ativinas e inibinas), fatores específicos do oócito como o GDF-9 e outros ainda não conhecidos. Esses fatores são importantes para o desenvolvimento folicular inicial e seus padrões de expressão são aparentemente relacionados com o estágio de desenvolvimento do folículo e do oócito. Por isso, ainda são necessárias muitas pesquisas com os folículos pré-antrais, para que se possa aplicar esta técnica de forma adequada para um melhor aproveitamento do material genético da fêmea.

5. REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, D.F. *et al.* Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-653, 2001.
- BASSO, A.C. **Análise ultraestrutural da viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos e vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) isolados mecanicamente.** 2001. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BECKERS, J.F. *et al.* The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reprod. Dom. Anim.**, v.31, p.543-548, 1996.
- BOLAMBA, D. *et al.* In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v.58, p.1689-1703, 2002.
- BOLAND, N.I. *et al.* Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.48, p.798-806, 1993.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicular growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p.165-171, 1997.
- BRITT, J.H. Impacts of early postpartum metabolism of follicular development and fertility. **Bov. Pract.**, v.24, p.39-43, 1991.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol. Reprod.**, v.43, p.543-547, 1990.
- BUTLER, H.W. Ultrastructural studies on mitochondrial swelling. **J. Biochem.**, v.118, p.883-886, 1970.
- CARAMBULA, S.F. *et al.* Dissociação mecânica de ovários de fetos bovinos para isolamento de folículos pré-antrais. In: XI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 1996, Canela, RS. **Anais...** Porto Alegre: Arq. Fac. Vet. UFRGS, 1996, p.235.

CECCONI, S. *et al.* *In vitro* development of sheep preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v.60, p.594-601, 1999.

DURRANT, B.S. *et al.* Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.917-932, 1998.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.41, p.268-276, 1989.

EPPIG, J.J.; TELFER, E.E. Isolation and culture of oocytes. **Meth. Enzymol.**, v.225, p.77-84, 1993.

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

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth development *in vitro* and *in vivo*. **Theriogenology**, v.49, p.415-422, 1998.

EPPIG, J.J.; WIIGGLESWORTH, K. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vitro*: oxygen concentration. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.447-456, 1995.

FAIR, T. *et al.* Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.817-832, 1997.

FIGUEIREDO, J.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.

FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1333-1346, 1994.

FORTUNE, J.E. *et al.* The primordial to primary follicle transition. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.163, p.53-60, 2000.

GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **J. Zoo.**, v.211, p.169-175, 1987.

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

- GUPTA, P.S.P. *et al.* Isolation of preantral follicles from buffalo ovaries. **Vet. Rec.**, v.148, p.580-581, 2000.
- GUPTA, P.S.P. *et al.* *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **Theriogenology**, v.57, p.1839-1854, 2002.
- GUTIERREZ, C.G. *et al.* Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long term culture *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1322-1328, 2000.
- HADDAD, A.; NAGAI, M.E. Radioautographic study of glycoprotein biosynthesis and renewal in the ovarian follicles of mice and the origin of the zona pellucida. **Cell Tissue Res.**, v.177, p.347-369, 1977.
- HERTING, A.T.; ADAMS, E.C. Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. **J. Cell Biol.**, v.34, p.647-675, 1967.
- HIRAO, Y. *et al.* *In vitro* growth on maturation of pig oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v.100, p.333-339, 1994.
- HIRAO, Y.; MIYANO, T.; KATO, S. Fertilization of *in vitro* growth mouse oocytes. **Theriogenology**, v.34, p.1071-1077, 1990.
- HYTTEL, P. *et al.* Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- HUANMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v.54, p.641-650, 2000.
- HULSHOF, S.C.J. *et al.* Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **Vet. Quart.**, v.16, p.78-80, 1994.
- ITOH, T. *et al.* Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biol. Reprod.**, v.67, p.1099-1105, 2002.
- JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v.45, p.889-895, 1996.
- JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. **Anim. Reprod. Sci.**, v.44, p.183-193, 1995.

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. **Anim. Reprod. Sci.**, v.44, p.183-193, 1996.

KATSKA, L.; RYNSKA, B. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. **Theriogenology**, v.50, p.213-222, 1998.

LINTERN-MOORE, S. *et al.* Follicular development in the infant human ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.39, p.53-64, 1974.

LUCCI, C.M. *et al.* Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rumin. Res.**, v.41, p.61-69, 2001.

LUNDY, T. *et al.* Population of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.115, p.251-262, 1999.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates on follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v.81, p.301-307, 1987.

MANDL, A.M.; ZUCKERMAN, S. The relation of age to numbers of oocytes. **J. Endocrinol.**, v.7, p.190-193, 1951.

MOTTA, P.M. *et al.* Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. **Arch. Histol. Citol.**, v.57, p.369-394, 1994.

NUTTINCK, F. *et al.* Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v.39, p.811-821, 1993.

NUTTINCK, F. *et al.* Histological and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigation. **Theriogenology**, v.45, p.1235-1245, 1996.

OKTAY, K. *et al.* Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertil. Steril.**, v.67, p.481-486, 1997.

PALTA, P.; CHAUHAN, M.S. Laboratory production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.10, p.379-391, 1998.

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

ROY, S.K.; GREENWALD, G.S. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. **J. Reprod. Fertil.**, v.87, p.103-114, 1989.

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

SAHA, S. *et al.* *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p.27-39, 2000.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; VAN STERTEGHEM, A.C. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.466-475, 1996.

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. **Anim. Sci.**, v.68, p.285-298, 1999.

TELFER, E.E. *et al.* *In vitro* development of oocyte from porcine and bovine primary follicles. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.163, p.117-123, 2000.

TORRANCE, C.; TELFER, E.E.; GOSDEN, R.G. Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. **J. Reprod. Fertil.** v.87, p.367-374, 1989.

VAN DEN HURK, R. *et al.* Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Hum. Reprod.**, v.4, p.833-841, 1998.

WANDJI, S.A. *et al.* Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biol. Reprod.**, v.55, p.942-948, 1996.

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, 1996a.

WOLGEMUTH, D.J. *et al.* Formation of the zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. **Develop. Biol.**, v.106, p.1-14, 1984.

WU, J.; EMERY, B.R.; CARRELL, D.T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v.64, p.375-381, 2001.