



## Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*

*Techniques for quality evaluation of ovarian preantral follicles cultured in vitro*

Maria Helena Tavares de Matos<sup>1</sup>, José Roberto Viana Silva, Ana Paula Ribeiro Rodrigues, José Ricardo de Figueiredo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará (UECE), CE, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [htmatos@yahoo.com](mailto:htmatos@yahoo.com)

### Resumo

As técnicas de avaliação da qualidade de folículos pré-antrais antes e após o cultivo *in vitro* permitem o monitoramento das alterações ocorridas *in vitro*, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais. A presente revisão mostra as diferentes técnicas utilizadas para avaliar a qualidade folicular antes e após o cultivo *in vitro*, tais como histologia clássica, microscopia eletrônica de transmissão, sistemas de detecção de apoptose, marcadores de viabilidade folicular e de proliferação de células da granulosa, bem como análise dos produtos de secreção folicular. A importância da utilização concomitante de diferentes técnicas também é discutida nesta revisão.

**Palavras-chave:** folículos pré-antrais, cultivo folicular *in vitro*, qualidade folicular...

### Abstract

*Techniques to evaluate preantral follicle quality before and after in vitro culture allow the accompaniment of changes occurring in vitro, being important to improve the systems of preantral follicles growth in vitro. The present review shows different techniques to evaluate follicular quality before and after in vitro culture, such as histology, transmission electron microscopy, systems to detect apoptosis, markers for follicle viability and proliferation of granulosa cells as well as analysis of products of follicular secretion. The importance of the concomitant utilization of different techniques is also discussed in this review.*

**Keywords:** preantral follicles, follicle *in vitro* culture, follicular quality.

### Introdução

O folículo ovariano é a unidade básica estrutural e funcional do ovário mamífero, pois fornece o ambiente necessário para o crescimento e a maturação oocitária (Gosden *et al.*, 1993). Apesar da grande população de folículos primordiais presentes no ovário mamífero, a maioria (99,9%) morre por atresia e somente poucos folículos conseguem chegar à ovulação (Mao *et al.*, 2002). A atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (Figueiredo *et al.*, 1999). As características estruturais e os eventos moleculares da apoptose (morte celular programada) diferenciam esse tipo de morte celular da necrose, na qual um grupo de células morre simultaneamente (Tilly, 1996), enquanto a apoptose sempre ocorre em uma única célula circundada por células normais (Kuan e Passaro, 1998).

Conforme o exposto acima, considerando-se o fato de que a quase totalidade dos oócitos será eliminada pelo processo de atresia, caso eles permaneçam no interior dos ovários, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (MOIFOPA) vem sendo desenvolvida com o objetivo de recuperar um grande número de oócitos inclusos nesses folículos e, posteriormente, cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação, prevenindo-os assim da atresia. Esta biotécnica poderá fornecer milhares de oócitos maduros, que podem ser utilizados para a multiplicação de animais de alto valor genético ou em via de extinção (Figueiredo *et al.*, 1999).

Nesse sentido, o desenvolvimento de um sistema que permita o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais e que resulte em oócitos aptos a serem maturados e fecundados *in vitro* seria de grande importância tanto para a compreensão da foliculogênese na fase inicial, como para a preservação a longo prazo de células germinativas femininas (Mao *et al.*, 2002). Vários trabalhos têm sido realizados no sentido de promover o crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* (camundongos: Eppig e Schroeder, 1989; ratas: Cain *et al.*, 1995; suínos: Wu *et al.*, 2001; bovinos: Gutierrez *et al.*, 2000; ovinos: Cecconi *et al.*, 1999; caprinos: Huanmin e Yong, 2000; felinos: Jewgenow e Stolte, 1996 e humanos: Roy e Treacy, 1993). Entretanto, as condições necessárias para o completo desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de animais domésticos e humanos ainda não foram estabelecidas. Isso se deve principalmente à falta de informação sobre a regulação do crescimento folicular e oocitário na fase pré-antral. Nesse sentido, a utilização de diferentes técnicas que permitam o monitoramento da qualidade e da viabilidade folicular antes e após o cultivo é importante para a melhoria dos

sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais.

Nesta revisão, serão abordadas técnicas utilizadas para analisar a morfologia, a ultra-estrutura e a viabilidade de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, além dos marcadores de atividade proliferativa celular.

### Técnicas para avaliação de folículos pré-antrais pós-cultivo *in vitro*

Várias técnicas são disponíveis para avaliar a morfologia e a ultra-estrutura dos folículos ovarianos pré-antrais. Com o auxílio dessas técnicas, pode-se analisar a ativação, o crescimento e a viabilidade folicular ao longo do período de cultivo *in vitro*. Em geral, os estudos realizados sobre cultivo utilizam as técnicas em conjunto (no mínimo duas) a fim de se obter uma maior precisão sobre a qualidade do folículo.

#### Técnicas utilizadas para detectar alteração ou degeneração folicular

##### Histologia clássica

A histologia é um método clássico que avalia a morfologia do citoplasma e do núcleo. A histologia clássica é uma técnica importante para avaliação do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, pois permite verificar o número e a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, por ocasião da ativação folicular, além de permitir analisar a integridade morfológica do oócito e das células da granulosa. Entretanto, essa técnica não permite avaliar a integridade das organelas citoplasmáticas. Gosden (2000) observou que a histologia clássica é relativamente pouco precisa se realizada imediatamente após a descongelamento do tecido ovariano, pois algumas alterações das organelas podem se manifestar somente algumas horas após este processo. Por outro lado, ela apresenta uma grande vantagem, que é a de possibilitar que um grande número de folículos seja avaliado, o que a torna uma técnica importante quando se deseja realizar uma análise quantitativa.

A histologia pode ser realizada tanto em folículos isolados como naqueles inclusos no córtex ovariano. Alguns autores mostraram que, na análise histológica, as alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (Jorio *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 1997). O processo de histologia clássica compreende as seguintes etapas: fixação, desidratação, diafanização ou clarificação, infiltração, inclusão, microtomia e coloração das lâminas. Em geral, nos protocolos-padrão de histologia, os fixadores mais utilizados são: paraformaldeído a 4% (Silva *et al.*, 2004a, b), bouin (Cushman *et al.*, 2001; Nilsson e Skinner, 2002) e carnoy (Matos *et al.*, 2004). As colorações mais comumente empregadas são: hematoxilina-eosina (HE) (Vendola *et al.*, 1999; Nilsson e Skinner, 2002) e Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-hematoxilina) (Cushman *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2004a, b; Fig. 1). Embora demande um pouco mais de tempo, a coloração PAS-hematoxilina apresenta a vantagem de permitir a visualização da zona pelúcida e da membrana basal, além dos demais componentes foliculares, como a membrana basal, as células da granulosa, o citoplasma e o núcleo do oócito. Além disso, existem vários trabalhos em que os folículos foram inclusos em resina e, por fim, corados com azul de toluidina (Abir *et al.*, 1997; Wandji *et al.*, 1996; Yu e Roy, 1999) ou Giemsa (Hemamalini *et al.*, 2003).

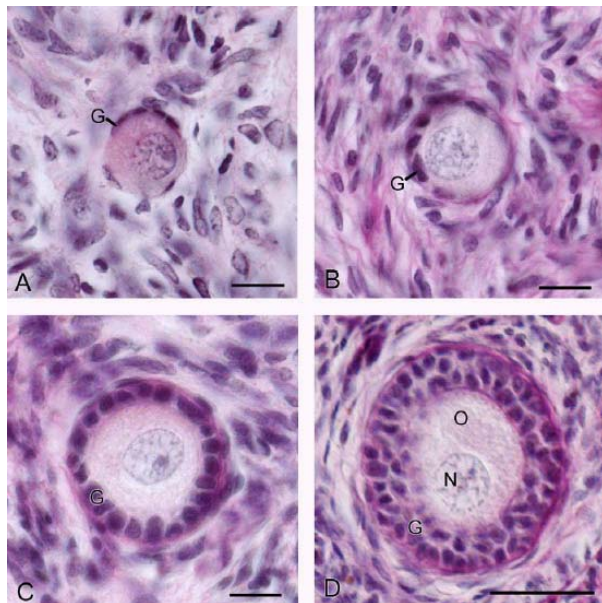


Figura 1. Estrutura histológica de folículos pré-antrais caprinos após coloração com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina, mostrando: (A) folículo primordial (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas), (B) transição (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas), (C) primário (oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas) e (D) secundário (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas). O: oócito; N: núcleo; G: células da granulosa. Barras; A, B e C = 12,5 µm e D = 25 µm. Fonte: Silva *et al.* (2004a).

### Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão é considerada uma boa técnica para avaliação das organelas celulares e das mudanças ultra-estruturais (Salehnia *et al.*, 2002) ocorridas durante a atresia folicular, sendo, portanto, um método mais preciso e eficiente do que a histologia clássica para avaliar os folículos pré-antrais após o cultivo *in vitro*. A microscopia eletrônica de transmissão também é eficiente logo após a descongelamento do tecido ovariano, pois é possível detectar alterações súbitas nas organelas, tais como o aumento de volume das mitocôndrias (Gosden, 2000). Alguns autores destacaram a importância da análise ultra-estrutural após conservação *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos, mostrando que folículos considerados normais após avaliação histológica poderiam apresentar alterações degenerativas na sua ultra-estrutura, tanto após o isolamento (Lucci *et al.*, 1999), como após resfriamento (Silva *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Lucci *et al.*, 2004a; Matos *et al.*, 2004) e criopreservação (Rodrigues *et al.*, 2004; Lucci *et al.*, 2004b).

No que se refere à utilização da microscopia eletrônica de transmissão para avaliar folículos pré-antrais após o cultivo, Eppig (1977) observou que oócitos de camundongos cultivados *in vitro* apresentavam aparência morfológica normal quando observados em microscopia ótica. Entretanto, a análise ultra-estrutural mostrou que existiam sinais de degeneração citoplasmática no oócito e nas células da granulosa. Além disso, esse autor mostrou que, após quatro dias de cultivo, a degeneração do oócito foi observada morfológicamente como um aumento na granulação do citoplasma, o que, na análise ultra-estrutural, foi visto como turgidez das mitocôndrias. Em outro estudo, após a análise ultra-estrutural de folículos pré-antrais de hamster cultivados por quatro dias, observou-se um aumento no número de mitocôndrias tanto do oócito quanto das células da granulosa, além de mitocôndrias arredondadas e numerosos retículos endoplasmáticos rugosos no ooplasma (Yu e Roy, 1999). Com a progressão do período de cultivo para 16 dias, a análise ultra-estrutural revelou que as células da granulosa de folículos normais encontravam-se bem organizadas e possuíam mitocôndrias redondas e alongadas, com crista bem desenvolvida. Esse aumento gradual no número e maturação das mitocôndrias durante os 16 dias de cultivo sugere que ocorreu desenvolvimento do oócito durante o período de cultivo. Da mesma forma, o desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso tanto no oócito como nas células da granulosa também sugere um aumento considerável na síntese de proteína, que é uma característica do processo de desenvolvimento celular (Yu e Roy, 1999). A análise ultra-estrutural de folículos secundários de ratas cultivados por seis dias mostrou que as células da granulosa e da teca normais possuíam retículo endoplasmático liso e mitocôndrias bem desenvolvidas (Zhao *et al.*, 2000). Além disso, o oócito parecia estar em contato com as células da granulosa por meio das junções comunicantes do tipo “gap”. Entretanto, nos folículos cultivados na ausência do soro, foram observadas alta condensação do material nuclear e presença de vacúolos e/ou gotas lipídicas nas células da granulosa, sugerindo a ocorrência de processo degenerativo. Ademais, as microvilosidades do oócito também não estavam bem desenvolvidas (Zhao *et al.*, 2000). Recentemente, Sadeu *et al.* (2006) observaram que havia folículos ultra-estruturalmente normais após 35 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano de fetos humanos. Esses autores observaram que folículos pré-antrais degenerados apresentavam inicialmente alterações ultra-estruturais no oócito. Recentemente, Matos *et al.*, (2007) utilizaram a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para confirmar a integridade ultra-estrutural de folículos pré-antrais caprinos após 7 dias de cultivo *in vitro* em meio suplementado com o Hormônio Foliculo Estimulante (Fig. 2).

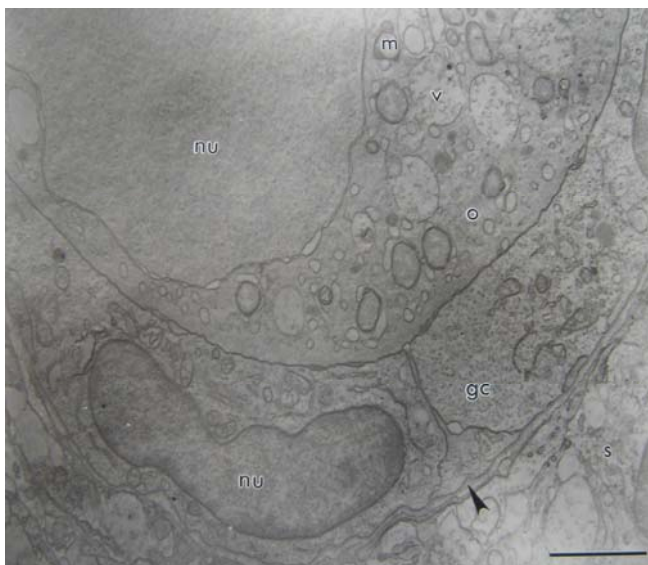


Figura 2. Micrografia eletrônica de um folículo pré-antral caprino após 7 dias de cultivo *in vitro* em meio suplementado com Hormônio Foliculo Estimulante. Notar que o folículo está circundado tanto por células pavimentosas (seta menor), como por células cuboidais (seta maior).

Fonte: Matos *et al.* (2007).

### *Técnicas utilizadas para detectar a viabilidade folicular (corantes vitais) e a apoptose*

#### *Azul de Trypan*

A coloração com azul de Trypan tem sido utilizada por vários pesquisadores para avaliar a viabilidade de folículos isolados após cultivo *in vitro* em diferentes espécies (felinos: Jewgenow, 1996; bovinos: Saha *et al.*, 2000; caprinos: Santos *et al.*, 2007). Esse corante avalia a integridade da membrana celular. Nos folículos não viáveis, com membranas danificadas, ocorre penetração do corante, que pode ser visualizada em microscópio invertido (Jewgenow *et al.*, 1998), constituindo uma maneira rápida de analisar a viabilidade de folículos cultivados (Jewgenow e Goritz, 1995). Amorim *et al.* (2003) mostraram que a técnica de coloração com Azul de Trypan pode ser utilizada de forma equivalente à histologia clássica, mostrando resultados similares quanto à viabilidade.

#### *Hoescht*

O corante *Hoescht* penetra em células vivas e tem sido largamente empregado em citologia com a finalidade de corar cromossomos. Com a utilização desse corante, avalia-se também a integridade da membrana celular (Saha *et al.*, 2000) e dos componentes nucleares (aparência da vesícula germinativa) (Jewgenow, 1998). Motlik e Fulka (1976) mostraram que a coloração de pequenos folículos pré-antrais com *Hoechst* permite a visualização ao microscópio de fluorescência de células da granulosa individualmente, determinando, assim, seu número e sua morfologia. Em felinos, observou-se uma mudança na aparência morfológica dos folículos isolados após cinco dias de cultivo em M199 suplementado com soro fetal bovino. Mais de 75% dos folículos estavam circundados por menos de 20 células da granulosa, e mais de 30% eram praticamente desnudos. Além disso, foi observado que a cromatina normal (estrutura com aparência reticular) foi substituída por uma cromatina degenerada (estrutura com aparência circular ou com distribuição compacta) (Jewgenow, 1996).

#### *TUNEL*

A técnica de *TUNEL* (terminal deoxynucleotidil tranferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling) utiliza uma enzima (transferase deoxynucleotidil terminal) para adicionar nucleotídeos aos fragmentos das fitas de DNA quebradas nas células apoptóticas. Essa técnica é utilizada para avaliar a fragmentação do DNA em seções histológicas (Tilly, 1996), permitindo a avaliação histológica, bem como a detecção do grau de apoptose (Pedersen *et al.*, 2003). A coloração do núcleo das células apoptóticas aparece mais escura ou marrom, enquanto as células normais ficam com uma coloração mais clara (Liu *et al.*, 2003).

Utilizando-se da técnica de *TUNEL*, Mao *et al.* (2002) observaram que, no início do cultivo, a porcentagem de células da granulosa apoptóticas em folículos frescos era 0,1%. Após quatro dias de cultivo, essa porcentagem aumentou significativamente para 3,4%. Em bovinos, também se observou que não havia células da granulosa coradas por *TUNEL* em folículos isolados frescos ou em folículos cultivados na presença de ácido ascórbico (Thomas *et al.*, 2001). Por outro lado, havia um número significativamente maior de células da granulosa apoptóticas em folículos cultivados na ausência do ácido ascórbico.

Além do *TUNEL*, existem outros tipos de marcadores para detecção da apoptose, que realizam a marcação das extremidades 3' dos fragmentos de DNA. Vários trabalhos têm utilizado um *kit ApopTag Plus* para detectar apoptose após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em ratas (McGee *et al.*, 1997; 2001) e vacas (Cushman *et al.*, 2001). Nessa técnica, os folículos normais não apresentam fluorescência ao serem analisados, enquanto os folículos atresícos mostram reação ao anticorpo marcado com fluoresceína (Cushman *et al.*, 2001). Em ratas, a adição do fator de crescimento transformante- $\beta$  ao meio de cultivo contendo FSH resultou em um aumento na coloração de folículos isolados (140 – 150  $\mu$ m) após 72h de cultivo, o que significa aumento na fragmentação de DNA e, conseqüentemente, aumento na ocorrência de apoptose (McGee *et al.*, 2001). Pedersen *et al.* (2003) mostraram que existe uma correlação entre a técnica de marcação da extremidade 3' dos fragmentos de DNA e a histologia clássica para análise das células da granulosa apoptóticas, exceto para os folículos em estágio avançado de atresia. Nesses folículos, existem poucas células da granulosa apoptóticas para serem detectadas pela análise do DNA, o que torna a técnica de marcação da extremidade 3' menos sensível do que a histologia clássica. Por outro lado, a marcação das extremidades do DNA visualiza especificamente a extremidade 3' da fita de DNA fragmentada, o que torna essa técnica mais sensível para detecção da apoptose do que a coloração com brometo de etídio (descrito posteriormente), que cora o DNA como um todo (Pedersen *et al.*, 2003).

#### *Brometo de etídio e iodeto de propídio*

O brometo de etídio é comumente utilizado como um corante de ácidos nucléicos. Ele se intercala nas moléculas dos ácidos nucléicos e, quando exposto à luz ultravioleta, emite uma cor vermelho-alaranjado (Silva *et*



*al.*, 2001). Quando uma célula encontra-se sob estresse, alguns dos sistemas de transporte ativo são afetados, seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática e, mais tarde, a sua permeabilização e posterior morte celular (Hewitt e Nebe-Von-Caron, 2001). O corante fluorescente brometo de etídio consegue atravessar uma membrana polarizada, mas só se liga às cadeias de DNA quando a célula possui um sistema de transporte afetado, pois um sistema de transporte ativo expulsaria o corante da célula (Midgley, 1987). Por ser um agente que intercala na molécula de DNA, o brometo de etídio é um poderoso mutagênico. Assim, a incorporação de brometo de etídio em organismos vivos pode causar mutações.

Recentemente, um estudo em que foi realizada a análise da atresia folicular em equinos mostrou que, em 25 dos 26 folículos (96%), houve uma correlação entre a técnica de marcação das extremidades 3' dos fragmentos de DNA (utilizando [<sup>32</sup>P] dideoxy-ATP) e a coloração com brometo de etídio no que se refere à classificação das células da granulosa em apoptóticas ou não apoptóticas (Pedersen *et al.*, 2003). Entretanto, essa última coloração requer uma maior quantidade de DNA quando comparada à técnica de marcação das extremidades 3' dos fragmentos de DNA (Pedersen *et al.*, 2003), além da alta toxicidade (potente cancerígeno) apresentada pelo brometo de etídio.

O iodeto de propídio também é um agente que intercala na molécula de DNA (corante de ácidos nucléicos) e emite uma fluorescência amarela e vermelha. O iodeto de propídio não penetra na membrana de células viáveis. A exclusão do iodeto de propídio é assim um método eficiente para detecção da integridade de membrana (Silva *et al.*, 2001). Entretanto, a melhor forma de entender o mecanismo da exclusão dos corantes é a utilização de corantes em misturas, ou seja, a associação de dois ou mais corantes. Assim como o brometo de etídio, o iodeto de propídio é um forte agente mutagênico. A coloração com iodeto de propídio foi utilizada para analisar a vesícula germinativa no oócito de folículos pré-antrais bovinos cultivados por 12 dias (Thomas *et al.*, 2001).

#### *Sais de tetrazolium*

A técnica do *kit* de proliferação celular com sais de tetrazolium é baseada na habilidade das células vivas em metabolizar o sal tetrazolium amarelo para cristais azuis, que podem ser solubilizados e quantificados por espectrofotometria (McGee *et al.*, 1997). No sentido de demonstrar que as alterações no diâmetro folicular representavam um aumento no número de células, McGee *et al.* (2001) realizaram uma análise do número de células viáveis nos folículos ao final do cultivo (72 h) e observaram que o tratamento com FSH aumentou este número em 56% comparado aos folículos não cultivados.

#### *Eletroforese e auto-radiografia*

Após eletroforese do DNA extraído de folículos suínos, Liu *et al.* (2003) observaram que, quando o folículo estava atrésico, uma marcação de DNA era visível, o que indicava a ocorrência da fragmentação do DNA em células da granulosa de folículos atrésicos. Murray *et al.* (2001) mostraram que os folículos de camundongos cultivados por seis dias em meio controle sem soro apresentavam altos níveis de apoptose, que foi mensurada por meio do grau de marcação das bandas de DNA. Quando o ácido ascórbico foi adicionado ao meio de cultivo, houve uma redução significativa da incidência de fragmentação de DNA comparado ao meio-controle. A fim de monitorar o desenvolvimento folicular *in vitro*, McGee *et al.* (1997) avaliaram a apoptose de folículos pré-antrais utilizando um sistema de cultivo de 24 h e observaram uma mínima fragmentação do DNA no início do cultivo (0 h). Entretanto, os autores relataram um aumento significativo na fragmentação do DNA internucleossomal ao final do cultivo.

#### *Marcadores de atividade proliferativa celular*

Conforme foi citado anteriormente, após a ativação dos folículos primordiais, ocorrem importantes mudanças no oócito e nas células da granulosa. No entanto, a detecção do início de crescimento de folículos primordiais depende da disponibilidade de marcadores sensíveis (Wandji *et al.*, 1996). Dentre os marcadores mais utilizados, pode-se citar: bromo-deoxiuridina (BrdU), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e timidina- H<sup>3</sup>, os quais estão descritos separadamente, a seguir.

##### *Bromo-deoxiuridina (BrdU)*

Para estimar a atividade metabólica das células foliculares, podem-se utilizar marcadores não-radioativos e, dentre estes, um dos mais utilizados é o BrdU. O BrdU é um marcador para a síntese de DNA *in vitro*. A incorporação de BrdU ao DNA das células na fase S do ciclo celular pode ser utilizada como um indicador de atividade proliferativa (Jewgenow, 1998). Para a detecção imunocitoquímica da incorporação de BrdU, realiza-se um protocolo padrão de imunocitoquímica (Jewgenow, 1996, 1998). Jewgenow (1998) mostrou que o procedimento com BrdU pode resultar em diferentes tipos de células marcadas, como oócitos e células da

granulosa. Além disso, este estudo também mostrou que aproximadamente 20 a 80% dos folículos pré-antrais felinos (dependendo do tratamento) estavam marcados após 6h de cultivo na presença de BrdU, enquanto de 1-3 células da granulosa por folículo encontravam-se marcadas. A marcação com BrdU tanto no oócito como nas células da granulosa indica atividade celular vital e evidencia um técnica rápida e eficiente para avaliar as condições de cultivo de folículos pré-antrais. Em ovinos, o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina-II (IGF-II), bem como o FSH, induziram uma forte marcação com BrdU em folículos pré-antrais (61-100  $\mu\text{m}$  de diâmetro) após 48 e 96 h de cultivo *in vitro* (Hemamalini *et al.*, 2003).

Sabe-se que os oócitos mamíferos sintetizam DNA no ovário embrionário. A replicação final do DNA ocorre durante o pré-leptóteno, no início da divisão meiótica. Logo após o nascimento, todos os oócitos estão no estágio de diplóteno da primeira divisão meiótica (Wassarman, 1988). Experimentos de marcação *in vivo* sugerem que a incorporação de BrdU em oócitos desse estágio pode ser explicada pela intensa renovação do DNA durante o crescimento oocitário (Jewgenow, 1998).

#### *Antígeno nuclear de proliferação celular*

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um marcador expresso por células em crescimento e proliferação (Wandji *et al.*, 1996). Após 2, 4 e 7 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de fetos bovinos, observou-se um aumento na expressão de antígeno nuclear de proliferação celular tanto no oócito como nas células da granulosa de folículos primários (Wandji *et al.*, 1996). A expressão do antígeno nuclear de proliferação celular no oócito pode ser devida ao fato de que esse antígeno é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta, que está envolvida no processo de reparo do DNA (Downey *et al.*, 1990). Assim, existe a possibilidade de que a DNA polimerase seja ativada em oócitos em crescimento para reparar o dano do material genético durante a transcrição (Wandji *et al.*, 1996). Em bovinos, houve uma redução na percentagem de folículos primordiais e um aumento dos folículos primários após estímulo exógeno de estradiol (Cushman *et al.*, 2001). Na espécie caprina, Silva *et al.* (2004a) observaram que, em fragmentos de córtex ovariano não cultivados, somente 5,5% dos folículos primordiais possuíam células da granulosa positivas para o antígeno nuclear de proliferação celular, enquanto 46,1% dos folículos em desenvolvimento (transição, primários e secundários) possuíam pelo menos uma célula da granulosa marcada pelo antígeno nuclear de proliferação celular. Esses autores também observaram que, após o cultivo (5 dias) de tecido ovariano caprino, não houve um aumento significativo das percentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento com células da granulosa positivas para o antígeno nuclear de proliferação celular, sugerindo que a atividade proliferativa das células da granulosa não foi alterada durante o cultivo (Fig. 3). O cultivo de fragmentos ovarianos de fetos babuínos revelou que, após 2 ou 4 dias, houve uma intensa coloração pelo antígeno nuclear de proliferação celular nas células da granulosa e no oócito da maioria dos folículos em crescimento (Wandji *et al.*, 1997).

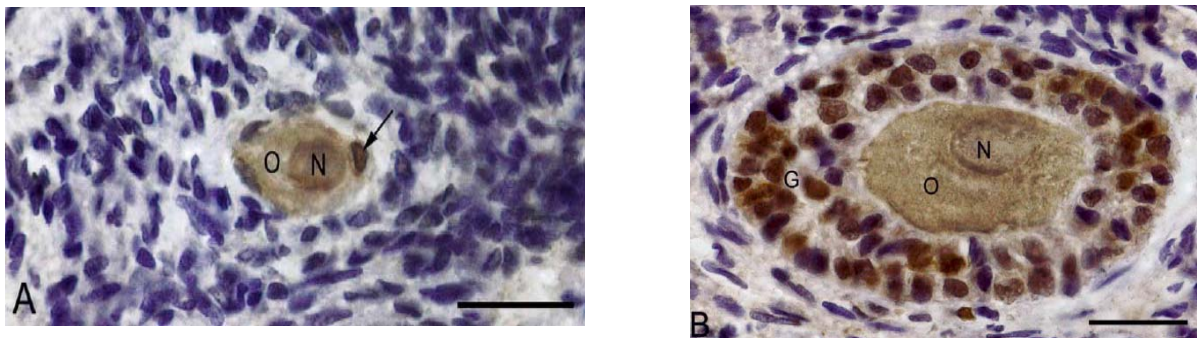


Figura 3. Secção de tecido ovariano após cultivo *in vitro*, mostrando: (A) um folículo primordial e (B) secundário com células da granulosa positivas para PCNA, coradas em marrom. O: oócito; N: núcleo do oócito; G: células da granulosa; seta: células positivas para PCNA em folículo primordial; barras: A: 25  $\mu\text{m}$ , B: 12,5  $\mu\text{m}$ .

Fonte: Silva *et al.* (2004a).

#### *Timidina triçada (Timidina- $\text{H}^3$ )*

No sentido de determinar se o crescimento folicular foi devido à proliferação celular, alguns trabalhos utilizaram a timidina- $\text{H}^3$ . Esse marcador radioativo é adicionado ao meio de cultivo ao final do mesmo, a fim de se realizar a contagem de células da granulosa marcadas e não marcadas. Geralmente, o índice de marcação é computado como a percentagem de células que incorporam a timidina- $\text{H}^3$ . Esse marcador foi utilizado com sucesso na detecção do início do crescimento de folículos primordiais bovinos (Braw-Tal e Yossefi, 1997). Além disso, após o cultivo por 6 dias de folículos pré-antrais bovinos, observou-se que o fator de crescimento

fibroblástico básico (bFGF) aumentou significativamente o índice de marcação das células da granulosa (Wandji *et al.*, 1996). Nilsson e Skinner (2002) utilizaram a timidina- $H^3$  como um indicador da proliferação das células da granulosa e da teca de ratas e, após 14 dias de cultivo com o fator de crescimento de diferenciação-9 (GDF-9), não observaram diferença significativa na proliferação dessas células. Os autores concluíram que o GDF-9 não estimulou diretamente a atividade proliferativa das células da granulosa e da teca. Yu e Roy (1999) associaram as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão à marcação com timidina- $H^3$  para verificar o crescimento de folículos primordiais de hamster durante 16 dias de cultivo. Esses autores observaram que as células da granulosa de folículos primários e secundários incorporaram timidina- $H^3$ , indicando que esses folículos estavam em crescimento.

#### *Produtos de secreção*

O crescimento e a diferenciação folicular durante o cultivo *in vitro* podem ser refletidos pela secreção de esteróides (Liu *et al.*, 2001). Considerando seu pequeno tamanho, os folículos secretam relativamente grandes quantidades de esteróides, tais como o estrógeno e a progesterona. Outras substâncias produzidas pelos folículos cultivados *in vitro* são a inibina e ativina (Smith *et al.*, 1994), além de produtos da atividade metabólica, como dióxido de carbono (Eppig, 1977) e lactato (Boland *et al.*, 1994).

Quando os folículos são cultivados individualmente, os produtos da secreção folicular são dificilmente detectados devido ao pequeno número de células presentes, mesmo quando há pouco volume de meio de cultivo *in vitro*. Para detectar esses produtos de secreção folicular, podem ser utilizadas análises de alta sensibilidade, entretanto análises das concentrações de RNAm indicando a expressão gênica ou imunohistoquímica com o uso de anticorpos para proteínas específicas são as técnicas mais indicadas (Hartshorne, 1997). Em geral, para a realização do radioimunoensaio, ao final do período de cultivo, o meio é coletado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

Vários estudos têm realizado análise hormonal após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Em camundongos, após cultivo de 4 dias de folículos isolados (100 – 105  $\mu\text{m}$ ), observou-se que a adição de FSH e ativina ao meio de cultivo aumentou significativamente a secreção de estrógeno e inibina (Liu *et al.*, 1998). Além disso, a produção de estrógeno é um indicador da proliferação e diferenciação das células da granulosa. Liu *et al.* (2002) cultivaram folículos pré-antrais isolados (100 – 120  $\mu\text{m}$ ) de camundongas e observaram que, do dia 4 ao 10 de cultivo *in vitro*, à medida que as células da granulosa proliferavam a produção de estrógeno aumentava. Esses mesmos autores mostraram que a atresia das células da granulosa está geralmente associada com a queda na produção folicular de estrógeno (Liu *et al.*, 2002). Nessa mesma espécie, foi relatado que folículos pré-antrais somente foram capazes de produzir estrógeno após a adição de FSH ao meio de cultivo, pois o FSH induziu a diferenciação das células da granulosa e a atividade da aromatase dessas células (Adriaens *et al.*, 2004). Essa relação entre a produção de estrógeno e o FSH também foi demonstrada durante cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos (Cecconi *et al.*, 1999). Em bovinos, foi relatado um aumento na secreção de estrógeno após 5 dias de cultivo de folículos isolados (147 – 170  $\mu\text{m}$ ). Essa concentração atingiu o máximo após 7 dias e permaneceu nos mesmos níveis até o final do cultivo (dia 13) (Itoh *et al.*, 2002). Nessa mesma espécie, observou-se um aumento na secreção de estrógeno pelos folículos cultivados por 12 dias em meio-controle, na presença ou não do ácido ascórbico (Thomas *et al.*, 2001).

Com relação à produção de progesterona, Adriaens *et al.* (2004) observaram que a secreção desse hormônio foi baixa ( $< 1 \mu\text{g/L}$ ) até o 12<sup>o</sup> dia de cultivo *in vitro* de folículos isolados de camundongas e aumentou significativamente 18 h após o início da ovulação. Após cultivo de 12 dias de folículos pré-antrais isolados de camundongas, Liu *et al.* (2001) mostraram que a concentração basal de progesterona permaneceu em 0,5 ng/ml até o dia 10 de cultivo. Entretanto, a partir do dia 10, foi observado um aumento dos níveis de progesterona (1,3 ng/ml), que foi atribuído à luteinização das células da granulosa.

O papel da inibina na regulação ovariana foi demonstrado em vários estudos. Dentre outras ações, a inibina influencia na produção de estrógeno pelas células da granulosa de ratas (Ying *et al.*, 1986) e age na regulação da maturação oocitária (Smitz e Cortvrindt, 1998). Em camundongos, a produção de inibina por folículos pré-antrais aumentou progressivamente a partir do dia 4 até o dia 12 de cultivo (Cortvrindt *et al.*, 1997). Na mesma espécie, mensurações dos níveis de inibina A e B secretadas após cultivo folicular por 8 dias indicaram que concentrações crescentes foram produzidas ao longo do cultivo (Newton *et al.*, 2002). Nesse mesmo estudo, os autores mostraram que os níveis de ativina secretada pelos folículos também aumentaram progressivamente durante o cultivo. Estes resultados foram acompanhados pelo aumento do diâmetro folicular de 115  $\mu\text{m}$  (dia 1) para 389  $\mu\text{m}$  (dia 8 de cultivo). Além disso, Magoffin e Jakimiuk (1997) realizaram um estudo sobre fluido folicular e mostraram que a concentração de inibina A aumenta com o aumento do tamanho folicular. Em ratas, após análise pela técnica de *Western blot*, observou-se um aumento dos níveis de inibina de folículos cultivados por 72 h em meio contendo FSH + fator de crescimento queratinócito (McGee *et al.*, 1999) ou FSH + ativina (McGee *et al.*, 2001), quando comparado ao controle.

### Considerações finais

As técnicas de avaliação do cultivo *in vitro* permitem o monitoramento da situação (qualidade e atividade) folicular antes e após o cultivo, sendo de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais. A análise morfológica e quantitativa (histologia clássica) dos folículos, a análise ultra-estrutural (microscopia eletrônica de transmissão) e da viabilidade folicular (Azul de Trypan, *Hoesch*), a detecção de apoptose (*TUNEL*), os marcadores que detectam o início do crescimento de folículos pré-antrais (BrdU, antígeno nuclear de proliferação celular e timidina- $H^3$ ), bem como a análise dos produtos de secreção folicular, são exemplos das diferentes técnicas que podem ser utilizadas para avaliar a qualidade do folículo após o cultivo *in vitro*.

Após o desenvolvimento *in vitro*, é necessária a manutenção da qualidade folicular para que se tenham oócitos aptos a serem maturados e fecundados *in vitro*, ou que possam ser utilizados em outras biotécnicas relacionadas à reprodução animal. Dessa forma, quanto mais parâmetros e técnicas forem utilizados em conjunto para avaliar os folículos pré-antrais após o cultivo *in vitro*, mais precisa será a interpretação da qualidade e da viabilidade folicular.

### Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado de Maria Helena T. Matos.

### Referências

- Abir R, Franks S, Mobberley MA, Moore PA, Margara, RA, Winston, RML.** Mechanical isolation and *in vitro* growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril*, v.68, p.682-688, 1997.
- Adriaens I, Cortvrindt R, Smitz J.** Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human Reprod*, v.19, p.398-408, 2004.
- Amorim CA, Rodrigues APR, Rondina D, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A.** Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril*, v.79, p.683-686, 2003.
- Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG.** Characterisation of follicular energy metabolism. *Human Reprod*, v.9, p.604-609, 1994.
- Braw-Tal R, Yossefi S.** Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, v.109, p.165-171, 1997.
- Cain L, Chatterjee S, Collins TJ.** *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology*, v.136, p.3369-3377, 1995.
- Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, Andrade ER, Bão SN, Figueiredo JR.** Effect of Braun-Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.195-208, 2001.
- Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M.** *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, v.60, p.594-601, 1999.
- Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC.** Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Human Reprod*, v.12, p.759-768, 1997.
- Cushman RA, DeSouza JC, Hedgpeth VS, Britt JH.** Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. *Biol Reprod*, v.65, p.581-586, 2001.
- Downey KM, Tan CK, So AG.** DNA polimerase delta: a second eucaryotic DNA replicase. *Bioessays*, v.12, p.231-236, 1990.
- Eppig JJ.** Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. *Dev Biol*, v.60, p.371-388, 1977.
- Eppig JJ, Schroeder AC.** Capacity of mouse oocyte from preantral follicles undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, v.41, p.68-276, 1989.
- Figueiredo JR, Silva JRV, Rodrigues APR.** Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). *Ciênc Anim*, v.9, p.11-25, 1999.
- Gosden RG.** Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.125-129, 2000.
- Gosden RG, Boland NI, Spears N, Murray AA, Chapam M, Wade JC, Zohdy NI.** The biology and technology of follicular oocyte development *in vitro*. *Reprod Med Rev*, v.2, p.29-152, 1993.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R.** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.
- Hartshorne G.** *In vitro* culture of ovarian follicles. *Rev Reprod*, v.2, p.94-104, 1997.
- Hemamalini NC, Rao BS, Tamilmani G, Amarnath D, Vagdevi R, Naidu KS, Reddy, KK, Rao VH.** Influence of transforming growth factor- $\alpha$ , insulin like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. *Small Rumin Res*, v.50, p.11-22,



2003.

- Hewitt CJ, Nebe-Voncaron G.** An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry*, v.44, p.179-187, 2001.
- Huanmin Z, Yong Z.** In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p.641-650, 2000.
- Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H.** 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, Göritz F.** The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. *Anim Reprod Sci*, v.39, p.285-297, 1995.
- 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, Stolte M.** Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. *Anim Reprod Sci*, 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 follicles during short-term culture. *Theriogenology*, v.49, p.1567-1577, 1998.
- Jewgenow K, Penfold LM, Meyer HH, Wildt DE.** Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J Reprod Fertil*, v.112, p.39-47, 1998.
- Jorio A, Mariana JC, Lahlou-Kassi A.** Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. *Anim Reprod Sci*, v.26, p.239-250, 1991.
- Kuan NK, Passaro EJr.** Apoptosis: programmed cell death. *Arch Surg*, v.133, p.773-775, 1998.
- Liu HC, He Z, Rosenwaks Z.** In vitro culture and in vitro maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertil Steril*, v.77, p.373-383, 2002.
- Liu J, Van Der Elst J, Van Den Broecke R, Dhont M.** Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod*, v.64, p.171-178, 2001.
- Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y.** Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v.139, p.2342-2347, 1998.
- Liu ZH, Yue KZ, Ma SF, Sun XS, Tan JH.** Effects of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulosa-cell apoptosis in the pig. *Theriogenology*, v.59, p.775-785, 2003.
- Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR, Gonçalves PBD.** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.39-49, 1999.
- Lucci CM, Kacinskis MA, Lopesa LHR, Rumpf R, Bão SN.** Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1101-1114, 2004a.
- Lucci CM, Kacinskis MA, Rumpf R, Bão SN.** Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology*, v.61, p.461-472, 2004b.
- Magoffin DA, Jakimiuk AJ.** Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women. *Human Reprod*, v.12, p.1714-1719, 1997.
- Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN.** Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol Reprod*, v.67, p.1197-1203, 2002.
- Matos MHT, Andrade ER, Lucci CM, Bão SN, Silva JRV, Santos RR, Ferreira MAL, Costa SHF, Celestino JJH, Figueiredo JR.** Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology*, v.62, p.65-80, 2004.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Bruno JB, Lopes CAP, Martins FS, Santos KDB, Rocha RMP, Silva JRV, Bão SN, Figueiredo JR.** Follicle Stimulating Hormone and Fibroblast Growth Factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.677-684, 2007.
- McGee EA, Chun SY, Lai S, He Y, Hsueh AJW.** Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. *Fertil Steril*, v.71, p.732-738, 1999.
- McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJW.** Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod*, v.64, p.293-298, 2001.
- McGee EA, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW.** Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, v.138, p.2417-2424, 1997.
- Midgley M.** An efflux system for cationic dyes and related compounds in *E. coli*. *Microbiol Sci*, v.4, p.125-128, 1987.
- Motlik J, Fulka J.** Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *J Exp Zool*, v.198, p.155-162, 1976.
- Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N.** Role of ascorbic in promoting

- follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction*, v.121, p.89-96, 2001.
- Newton H, Wang Y, Groome NP, Illingworth P.** Inhibin and activin secretion during murine preantral follicle and following HCG stimulation. *Human Reprod*, v.17, p.38-43, 2002.
- Nilsson EE, Skinner MK.** Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Bio. Reprod*, v.67, p.1018-1024, 2002.
- Pedersen HG, Watson ED, Telfer EE.** Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation. *Reproduction*, v.125, p.417-423, 2003.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos, MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004.
- Roy SK, Treacy BJ.** Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-790, 1993.
- Sadeu JC, Cortvrindt R, Rone-El R, Kasterstein E, Smitz J.** Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.85, p.1130-1141, 2006.
- Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y.** *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.63, p.27-39, 2000.
- Salehnia M, Moghadam EA, Velojerdi MR.** Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.78, p.644-645, 2002.
- Santos RR, Van den Hurk R, Rodrigues APR, Costa SHF, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR.** Effect of cryopreservation, activation and growth of *in situ* and isolated ovine early-stage follicles. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.53-64, 2007.
- Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Bão SN, Costa SHF, Santos RR, Figueiredo JR.** Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Theriogenology*, v.54, p.809-822, 2000.
- Silva JRV, Van den Hurk R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RNB, Figueiredo JR.** Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.273-286, 2004a.
- Silva JRV, Van den Hurk R, Matos MHT, Santos RR, Pessoa C, Moraes MO, Figueiredo JR.** Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691-1704, 2004b.
- Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC.** Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Bol Biotecnol*, p.32-40, 2001.
- Smith CD, Gosden RG, McNeilly AS, Hillier SG.** Effect of inhibin immunoneutralisation on steroidogenesis in rat ovarian follicles *in vitro*. *J Endocrinol*, v.140, p.437-443, 1994.
- Smitz J, Cortvrindt R.** Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture. *Human Reprod*, v.13, p.927-935, 1998.
- Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE.** Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture *Reproduction*, v.122, p.487-495, 2001.
- Tilly JL.** Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod.*, v.1, p.162-172, 1996.
- Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA.** Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol Reprod*, v.61, p.353-357, 1999.
- Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig EE, Fortune JE.** Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Human Reprod*, v.12, p.1993-2001, 1997.
- Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig EE, Fortune JE.** Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod*, v.55, p.942-948, 1996.
- Wassarman P.** The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988. p.69-102.
- Wood TC, Montali RJ, Wildt DE.** Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev*, v.46, p.190-200, 1997.
- Wu J, Benjamin RE, Carrell DT.** *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v.64, p.375-381, 2001.
- Ying SY, Becker A, Ling N, Ueno N, Guillemin R.** Inhibin and  $\beta$ -type transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) have opposite modulating effects on follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.136, p.969-975, 1986.
- Yu N, Roy SK.** Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary *in vitro*: effect of insulin. *Biol Reprod*, v.61, p.1558-1567, 1999.
- Zhao J, Dorland M, Taverne MAM, Van der Weijden GC, Bevers MM, Van den Hurk R.** *In vitro* culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicular interactions. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.65-74, 2000.