

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS ISOLADOS MECANICAMENTE EM DIFERENTES ESTÁGIOS REPRODUTIVOS E PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS OVARIANOS¹

MECHANICAL ISOLATION OF CAPRINE PREANTRAL FOLLICLES AT DIFFERENT REPRODUCTIVE STAGES AND OVARIAN SITUATION

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

RESUMO

O presente trabalho descreve os efeitos do estágio reprodutivo (animais impúberes, adultos não-gestantes e gestantes), posição anatômica do ovário (direito e esquerdo) presença de corpo lúteo funcional, peso do ovário e número de folículos antrais superficiais (FAS) sobre o número de folículos pré-antrais (FPA) isolados mecanicamente. Os FPA isolados foram divididos em 3 classes a saber: primordiais, primários e secundários. O número médio (\pm EP) de FPA isolados por ovário foi de 1.324 ± 193 ; 866 ± 170 e 779 ± 139 , respectivamente para ovários oriundos de animais impúberes, não-gestantes e gestantes, sendo observada diferença significativa somente entre animais impúberes e gestantes. A posição anatômica do ovário (exceto para os animais não-gestantes) e a presença ou ausência de corpo lúteo não exerceram nenhum efeito sobre o número e distribuição dos FPA isolados. De um modo geral, o número de folículos primários e secundários foi negativamente correlacionado com o peso ovariano. Já o número de folículos primordiais e secundários foi, respectivamente, positiva e negativamente correlacionado com o número de FAS. Analisando as categorias de animais isoladamente, observou-se que, nos animais impúberes, o número de folículos primordiais foi positivamente correlacionado com o número de FAS, enquanto que o número de folículos primários e secundários foi negativamente correlacionado com o número de FAS. No tocante à categoria de animais gestantes, o número de folículos primários foi negativamente correlacionado com o peso ovariano. Dependendo da categoria de ovários estudada, foram observadas associações significativas entre o número de folículos primordiais, primários e secundários.

Palavras-chave: folículos pré-antrais, estágio reprodutivo, corpo lúteo, ovário, caprino.

SUMMARY

The aim of this study was to describe the effects of reproductive stages (pre-pubertal, non-pregnant and pregnant adult animals), ovarian anatomic position (left or right), presence of functional corpus luteum, ovarian weight and number of superficial antral follicles on the number of preantral follicles mechanically isolated. The mean number (mean \pm SEM) of isolated preantral follicles per ovary was $1,324 \pm 193$, 866 ± 170 and 779 ± 139 , respectively for prepubertal, non-pregnant and pregnant adult animals. Anatomic position (except for non-pregnant animals) and the presence or absence of corpus luteum did not affect the number and distribution of isolated preantral follicles. In general, the number of primary and secondary follicles was negatively correlated with the ovarian weight. The numbers of primordial and secondary follicles were, respectively, positively and negatively correlated with the number of superficial antral follicles. Analyzing animal categories separately, it was observed that in prepubertal animals, the number of primordial follicles was positively correlated with the number of superficial antral follicles. However the numbers of primary and secondary follicles were negatively correlated with the number of superficial antral follicles. In the category of pregnant animals, the number of primary follicles was negatively correlated with the ovarian weight. According to ovary category analyzed, were observed significant correlation between the number of primordial, primary and secondary isolated follicles.

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 CEP 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).

Key words: *preantral follicles, reproductive stage, corpus luteum, ovary, caprine.*

INTRODUÇÃO

O número de folículos ovarianos pré-antrais em mamíferos domésticos é estabelecido durante a vida fetal, no fim da multiplicação oogonial (RÜSSE, 1983). Estudos histológicos mostraram que a população de folículos ovarianos pode ser afetada por vários fatores como genéticos, etário (ERICKSON, 1966b), racial (CAHILL & MÁULEON, 1980) e níveis hormonais (PETERS, 1976). *In vitro*, folículos ovarianos pré-antrais isolados, mecânica ou enzimaticamente, têm sido investigados por diversos pesquisadores em diferentes espécies domésticas como os bovinos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; NUTTINCK *et al.*, 1993), suínos (GREENWALD & MOOR, 1989) e felinos (JEWGENOW & PITRA, 1993). Recentemente, folículos pré-antrais de fetos ovinos foram isolados enzimaticamente (CARAMBULA *et al.*, 1996). RODRIGUES *et al.* (1996) demonstraram que um grande número de folículos pré-antrais pode ser isolado mecanicamente a partir de ovários caprinos. Os resultados deste estudo, bem como os de outros autores referidos acima, revelaram uma grande variação individual no tocante ao número de folículos pré-antrais isolados por ovário. Entretanto, a causa desta variação ainda não é conhecida.

O objetivo deste estudo foi verificar se a fase reprodutiva da fêmea caprina (animais impúberes, adultos não-gestantes e gestantes), posição anatômica dos ovários (direito e esquerdo), presença de corpo lúteo funcional, peso e número de folículos antrais superficiais podem afetar o número e distribuição de folículos pré-antrais caprinos, isolados mecanicamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste experimento, foi utilizado um total de 52 ovários provenientes de cabras em diferentes estágios reprodutivos, a saber: animais impúberes (IMP) - n=18; adultos não-gestantes (ANG) - n=16 e adultos gestantes (AG) - n=18. Os ovários foram extraídos cirurgicamente por ovariectomia no laboratório ou coletados em mata-douros locais.

Imediatamente após a coleta (cirúrgica ou em matadouro), os ovários foram lavados com álcool a 70% por 10 segundos e, em seguida, com solução salina a 0,9%. Após a lavagem, os ovários foram colocados em frascos, contendo também solução salina a 0,9%, mantidos a uma temperatura de 37° C

e conduzidos ao laboratório dentro de uma caixa térmica. Antes de iniciar o processo de isolamento dos folículos pré-antrais, os ovários foram caracterizados morfológicamente. Todos os ovários foram analisados e registrados os dados referentes à posição anatômica (ovários direito e esquerdo), peso (g), presença ou ausência de corpo lúteo (CL) funcional, corpo albicans (CA) e número de folículos antrais superficiais (FAS).

O isolamento folicular foi realizado segundo o protocolo descrito por RODRIGUES *et al.* (1996), no máximo 1 hora após a coleta dos ovários. Após o isolamento folicular, os folículos pré-antrais isolados foram classificados em primordiais, primários e secundários, segundo HULSHOF *et al.* (1994).

Para comparar as médias obtidas para os parâmetros peso dos ovários e o número de FAS entre as diferentes categorias de animais, foi utilizado o teste-t. Os efeitos do estágio reprodutivo do animal, posição anatômica do ovário (direito e esquerdo) e presença de corpo lúteo sobre o número, bem como a distribuição dos folículos pré-antrais isolados nas três classes foram avaliados pelo teste de Whitney-Mann, considerando-se que os dados não obedeceram a uma distribuição normal. A correlação de Spearman foi utilizada para verificar as associações entre o número e a distribuição dos folículos isolados e o número de folículos antrais superficiais, bem como o peso ovariano. A mesma correlação foi utilizada para testar as associações entre o número de folículos pré-antrais isolados nas diferentes classes (primordiais, primários e secundários). Os resultados serão expressos sob a forma de média \pm erro padrão da média (EP) e considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores médios obtidos para o peso (g) e número de FAS macroscopicamente visíveis são mostrados na Tabela 1. Analisando os ovários por categoria de animais (impúberes, não-gestantes e gestantes), verificou-se que o peso dos ovários de animais impúberes foi significativamente inferior ($P < 0,05$) quando comparados com os ovários de animais não-gestantes e gestantes. No tocante ao número de FAS, nenhuma diferença significativa foi observada entre as 3 categorias de ovários estudadas. Considerando o número total de ovários analisados, uma média de 994 ± 101 folículos pré-antrais foram isolados por ovário. Respectivamente, para os ovários de animais impúberes, não-gestantes e gestantes, o número de folículos isolados foi de 1.324 ± 193 ; 866 ± 170 e 779 ± 139 (Tabela 1). Verificou-se que

Tabela 1 - Valores médios (\pm EP) de peso (g), número de FAS, e FPA isolados por ovário de animais ímpúberes, não-gestantes e gestantes.

Estágio Reprodutivo	N	Peso (g)	FAS	FPA isolados (média \pm EP)	Varição
Ímpúberes	18	0,4 \pm 0,11 ^a	24 \pm 4,7 ^a	1324 \pm 193 ^a	389 - 2974
Não-gestantes	16	1,1 \pm 0,07 ^b	20 \pm 3,5 ^a	866 \pm 170 ^{ab}	70 - 2559
Gestantes	18	1,1 \pm 0,14 ^b		779 \pm 139 ^b	152 - 2430
Valor médio do Total	52	0,9 \pm 0,08	21 \pm 2,1	994 \pm 101	70 - 2974

^{ab} (P<0,05) na mesma coluna.

o número de folículos isolados nos animais ímpúberes e gestantes foi significativamente diferente (P<0,05). Os resultados mostraram também que independente da origem do ovário, o número de folículos pré-antrais isolados por ovário foi extremamente variável. Os limites mínimo e máximo dessa variação foram, respectivamente, 70 e 2.974 folículos por ovário.

No que concerne ao efeito da posição anatômica do ovário sobre o número total de folículos pré-antrais isolados, de um modo geral, o número médio de folículos pré-antrais isolados entre os ovários direito e esquerdo não diferiram significativamente (P>0,05), exceto nos animais não-gestantes, nos quais o ovário direito superou o esquerdo (P<0,05). No tocante à distribuição folicular, considerando-se o número total de ovários analisados, observou-se que o número de folículos primordiais, primários e secundários isolados diferiram significativamente (P<0,05) nos ovários direito e esquerdo. Resultados similares foram observados para os animais gestantes em ambos os ovários, e nos animais não-gestantes somente para os ovários esquerdos.

O número médio de folículos pré-antrais, isolados nos ovários com e sem corpo lúteo, foi de 799 \pm 193 e 838 \pm 174 respectivamente, mostrando que não houve efeito significativo da presença do corpo lúteo sobre o número de folículos isolados. Foi verificado ainda que, tanto na presença, como na ausência do corpo lúteo, o número de folículos isolados diminuiu significativamente dos primordiais para os secundários.

Pode-se observar na Tabela 2 os resultados das associações entre o número e distribuição de folículos pré-antrais e o peso do ovário e número de FAS. De um modo geral, o número de folículos primários e secundários foi negativamente correlacionado com o peso ovariano. Já o número de folículos primordiais e secundários foi, respectivamente, positiva e negativamente correlacionado com o número de FAS. Analisando as categorias de animais

isoladamente, observou-se que, nos animais ímpúberes, o número de folículos primordiais foi positivamente correlacionado com o número de FAS. enquanto que o número de folículos primários e secundários foi negativamente correlacionado com o número de FAS. Já a Tabela 3 mostra as associações entre o número de folículos primordiais, primários e secundários iso-

lados. No tocante à categoria de animais gestantes, o número de folículos primários foi negativamente correlacionado com o peso ovariano. Dependendo da categoria de ovários estudada, foram observadas associações significativas entre o número de folículos primordiais, primários e secundários.

DISCUSSÃO

Do total de ovários analisados, foi observado que os valores encontrados para o peso ovariano em animais adultos gestantes e não-gestantes foi superior àquele observado em animais ímpúberes. Esta constatação é explicada pelo fato de, diferentemente de animais jovens, os ovários oriundos de animais adultos (gestantes e não-gestantes) conterem um maior conteúdo fibroso (NICOSIA *et al.* 1975) e poderem apresentar corpo(s) lúteo(s), os quais contribuiriam para aumentar o peso dos ovários (GONZÁLEZ-STAGNARO & MADRID-BURY, 1993).

Estudos histológicos em bovinos descreveram que o número de folículos pré-antrais permanece estável até o quarto ou sexto ano de vida, declinando, consideravelmente, em animais de idade bem avançada (ERICKSON, 1966b). No presente estudo, observou-se que o número de folículos pré-antrais caprinos, isolados mecanicamente nos animais não-gestantes, não diferiu significativamente do número de folículos pré-antrais isolados nos animais ímpúberes e gestantes. Portanto, estes resultados estão de acordo com a assertiva anterior e sugerem que o número de folículos pré-antrais é pouco alterado em animais com idade viável para desempenhar uma atividade reprodutiva. Ao contrário, o número de folículos pré-antrais, isolados em animais ímpúberes, foi superior àquele isolado em animais adultos gestantes discordando das observações histológicas de ERICKSON (1966b). Porém, este resultado pode ser devido a fatores como a presença de maior conteúdo fibroso e tecido cicatricial (corpo albicans) nos

Tabela 2 - Associações entre o número de folículos pré-antrais isolados e o peso ovariano e número de FAS.

Estágio	PESO			FAS		
	Classes			Clí.sses		
Reprodutivo	Primordial	Primário	Secundário	Primordial	Primário	Secundário
Impúberes	0,2542	-0,3693	-0,3076	0,7296***	-0,7950***	-0,7120***
Não-gestantes	0,3051	0,1239	0,0552	-0,0902	0,2016	-0,2669
Gestantes	-0,0808	-0,5262*	-0,2169	-0,0921	0,4366	0,3618
TOTAL	0,0176	-0,3836**	-0,3719*	0,5014***	-0,1632	-0,2761*

(P<0,05)**; (P<0,005)***; (P<0,001)****; (P<0,0001)

Tabela 3 - Associações entre o número de folículos primordiais, primários e secundários nos diferentes estágios reprodutivos.

Estágio	CLASSES DE FOLÍCULOS			
	Reprodutivo	Primordial X Primário	Primário X Secundário	Primordial X Secundário
Impúberes		-0,7750"	0,8039**	-0,8555***
Não-gestantes		0,5929*	0,2130	0,5192"
Gestantes		0,3189	0,5843*	0,2161
TOTAL		-0,0554	0,6211**	-0,1300

(P<0,05): " (P<0,0005); *** (P<0,0001)

ovários de animais adultos (gestantes). A presença destes tecidos aumenta a rigidez e resistência do tecido ovariano ao corte no cortador de tecidos, conseqüentemente, reduzindo o rendimento do isolamento mecânico de folículos pré-antrais. FIGUEIREDO *et al.* (1993) também demonstraram que o número médio de folículos pré-antrais isolados variou, significativamente, conforme o estágio reprodutivo da fêmea bovina (fetos, novilhas e vacas adultas). No presente trabalho, apesar da quantidade de folículos pré-antrais isolados nos animais impúberes ter sido numericamente superior àquela observada para os animais não-gestantes, a diferença não foi significativa. Este resultado pode ser devido à grande variação individual no número de folículos isolados nas categorias de ovário estudadas.

No tocante à posição anatômica do ovário, exceto para os animais não-gestantes, o número de folículos isolados entre os ovários direito e es-

querdo não diferiram significativamente. De acordo com estudos histológicos de ERICKSON (1966a) em bovinos e de KOERING *et al* (1994) em primatas, não existe diferença significativa no número de folículos pré-antrais (primordiais) observados entre ambos os ovários. Em caprinos, no caso de animais não-gestantes, o número de folículos isolados nos ovários direitos

superou o número de folículos isolados nos ovários esquerdos. A razão para este resultado, porém, é desconhecida. No tocante ao corpo lúteo, este estudo mostrou que a presença desta estrutura não afetou, significativamente, o número e a distribuição de folículos pré-antrais isolados nas diferentes classes. Estes resultados confirmam os de outros autores, os quais mostraram que o processo de ativação e crescimento dos folículos ovarianos (foliculogênese), uma vez iniciado, não mais será cessado, continuando ininterruptamente, inclusive por ocasião

da gestação, pseudogestação e lactação (HIRSHPIELD, 1991; SAUMANDE, 1991).

Considerando o número total de ovários analisados (direito e esquerdo) e igualmente para os animais gestantes e não-gestantes, nestes últimos somente para o ovário esquerdo, observou-se que o número total de folículos isolados decresceu, significativamente, dos folículos primordiais para os secundários. Estes dados estão de acordo com aqueles relatados em fetos ovinos (CARAMBULA *et al*, 1996). ERICKSON (1986) mostrou que, em humanos, os folículos primordiais correspondem a 90%-95% da população total de folículos no ovário. No tocante às diferenças encontradas entre o número de folículos primários e secundários isolados nos animais impúberes, resultados similares também foram descritos em bovinos (FIGUEIREDO *et al*, 1993; HULSHOF *et al*, 1994) e em felídeos (JEWGENOW & STOLTE, 1996).

Neste trabalho também foram estudadas as associações entre o número de folículos pré-antrais isolados e o peso do ovário e número de folículos antrais superficiais. Considerando o número total de ovários analisados, verificou-se que o número de folículos primários e secundários foi negativamente correlacionado com o peso ovariano e o número de FAS. No que concerne aos animais gestantes, foi observado uma correlação negativa entre o número de folículos primários e o peso ovariano. Acredita-se que os resultados obtidos em relação ao peso do ovário estejam diretamente relacionados com a composição do tecido ovariano, onde ovários mais pesados podem apresentar maior conteúdo fibroso, proporcionando, portanto, uma maior dificuldade no processo de isolamento folicular. No que concerne aos FAS, a presença destes poderia afetar, dramaticamente, o fluxo sanguíneo em determinadas regiões do ovário, alterando a passagem normal de nutrientes para os folículos e, conseqüentemente, reduzindo o número de folículos em crescimento (primários e secundários) (HIRSHFIELD, 1991). No caso dos folículos primordiais, o seu número foi positivamente correlacionado com os FAZ, tanto para o total de ovários analisados como para a categoria de animais impúberes. Isto pode ser devido ao fato de que a presença dos FAS poderia estar impedindo a ativação dos folículos primordiais, causando o acúmulo destes folículos no "pool" de reserva.

No tocante à relação entre as classes de folículos isolados e considerando o total de ovários analisados, observou-se que o número de folículos primários e secundários foi positivamente correlacionado. A partir do momento em que um folículo primordial torna-se ativo (folículo primário), há uma grande probabilidade que o mesmo torne-se um folículo secundário, visto que os folículos ovarianos podem seguir somente dois destinos, isto é, continuar o seu crescimento ou ser eliminado por atresia. Como na fase pré-antral da foliculogênese, o processo de atresia, ou morte folicular, é menos freqüentemente observado do que na fase antral (LUSSIER *et al.*, 1987; HIRSHFIELD, 1988), haveria uma tendência à proporcionalidade entre o número de folículos primários e secundários. Várias hipóteses foram sugeridas por diferentes pesquisadores no sentido de esclarecer os mecanismos envolvidos na ativação dos folículos primordiais. EDWARDS *et al.* (1977) propuseram que o número de folículos pré-antrais que deixa o *pool* de reserva (folículos primordiais) é predeterminado geneticamente. HIRSHFIELD (1994) sugeriu que em ratos jovens, o número de folículos presentes no *pool* de reserva é inversamente proporcional ao número de folículos pré-antrais em crescimento. Uma outra hipótese

proposta é a de que o FSH também exerce efeito sobre a ativação dos folículos primordiais (BETTERIDGE *et al.* 1989). No presente estudo, foi observado que para os animais jovens (impúberes), o número de folículos primordiais isolados foi negativamente correlacionado com o número de folículos primários e secundários, enquanto que para os animais adultos (não-gestantes) observou-se uma correlação positiva entre o número de folículos primordiais isolados e o número de folículos primários e secundários. Estes resultados poderiam ser explicados, considerando-se as hipóteses acima mencionadas. No caso específico dos animais impúberes, onde as concentrações plasmáticas de gonadotrofinas hipofisárias são baixas, o número de folículos do "pool" de reserva permaneceria elevado em função dos baixos níveis de FSH, hormônio que seria necessário em níveis elevados para a sua ativação. Já o oposto poderia ser observado nos animais adultos, onde os níveis de FSH são mais altos, o que poderia favorecer a ativação dos folículos primordiais, o que provavelmente explicaria a correlação positiva. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados previamente. ERICKSON (1966b) e ERICKSON *et al.* (1976) mostraram uma correlação positiva entre o número de folículos primordiais e o número de folículos em crescimento em ovários de vacas.

Concluindo, foi demonstrado que o número e distribuição dos folículos pré-antrais caprinos, isolados mecanicamente, podem ser influenciados pelo estágio reprodutivo, peso e número de folículos antrais superficiais. Entretanto, o efeito destes parâmetros morfométricos depende da categoria de ovário estudada. Já a posição anatômica do ovário, bem como a presença ou ausência de corpo lúteo funcional, sob as mesmas condições de isolamento mecânico, não exercem efeito sobre o número de folículos pré-antrais caprinos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTERIDGE, K.J., SMITH, C. STUBBINGS, R.B., *et al.* Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal in vitro. **Journal of Reproduction & Fertility**, (Suppl) v. 38, p. 87-98, 1989.
- CAHILL, L.P., MAULÉON, P. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 58, p. 321-328, 1980.
- 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**, v. 24, (supl.) p. 236, 1996.
- EDWARDS, R.G., FOWLER, R.E., GORE-LANGTON, R.E., *et al.* Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 51, p. 237-263, 1977.

- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 10, p. 97-105, 1966a.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**, v. 25, p. 800-805, 1966b.
- 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.
- ERICKSON, G.F. Na analysis of follicle development and ovum maturation. In: SEMINARS IN REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY, 1986, San Diego, California. **Anais...** San Diego, Reproductive Endocrinology, 1986, p. 233-254.
- 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., R. M. MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 87, p. 561-571, 1989.
- GONZÁLEZ-STAGNARO, C, MADRID-BURY, N. Câmbios ováricos durante el ciclo estrual en cabras criollas. **Revista Científica**, v. 3, p. 87-97, 1993.
- HIRSHFIELD, A.N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1181-1188, 1988.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International review of cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.
- HIRSHFIELD, A.N. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 421-428, 1994.
- 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. 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. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 183-193, 1996.
- KOERING, M., DANFORTH, D.R., HODGEN, G.D. Early follicle growth in the juvenile macaca monkey ovary: the effects of estrogen priming and follicle-stimulating hormone. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 50, p. 686-694, 1994.
- LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 81, p. 301-307, 1987.
- NICOSIA, S.V., EVANGELISTA, I., BATTÀ, 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.
- RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A., LUCCI, CM. *et al.* Desenvolvimento de um método mecânico para o isolamento de folículos pré-antrais a partir de ovários oriundos de cabras nativas da região Nordeste do Brasil. In: V ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1996. Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza, Universidade Estadual do Ceará, 1996, p. 480.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.
- SAUMANDE, J. La folliculogênese chez les ruminants. **Recueil Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 205-218, 1991.