

Aplicaciones biotecnológicas del desarrollo *in vitro* de folículos bovinos obtenidos de ovarios fetales o prepúberes. Revisión de literatura.

Jorge Garcés^{1a}, María P Vélez, Neil Vásquez¹, Biol. MS; Bernardo Agudelo^{1,2}, MD, GO;
Juan G Maldonado, MVZ, MS.

¹Grupo de Teriogenología, Centro de Investigaciones Pecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; Programa de Biogénesis y ²Departamento de Ginecología y Obstetricia, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín.

^aEstudiante de Biología

^bEstudiante de Medicina Veterinaria

(Recibido: 19 julio, 99; aceptado: 10 septiembre, 99)

Resumen

En nuestro país se ha desarrollado en la presente década toda una infraestructura de grupos de investigación, enfocados en la producción in vitro de germoplasma animal, en donde la maduración de gametos (IVM), la fertilización (FIV), y el desarrollo embrionario (IVD) in vitro han logrado grandes avances. En 1996 se publicó en la literatura internacional el primer trabajo que logró reproducir el desarrollo folicular in vitro, a partir de folículos primordiales en ratones. Nuestro grupo de investigación se propuso estandarizar el modelo de desarrollo de folículos bovinos in vitro, a partir de folículos primordiales obtenidos de ovarios fetales, con el fin de contribuir al desarrollo de otras alternativas biotecnológicas de la reproducción animal y de disponer de un modelo para el estudio de medicamentos y compuestos de uso potencial en la reproducción, previo a su aplicación en estudios in vivo. En la presente revisión se hace un aporte crítico sobre la información publicada en el campo del desarrollo folicular in vitro, y se proponen alternativas de investigación en las cuales el modelo de estudio sería de gran utilidad científica y clínica.

Palabras clave: Bovinos, Dinámica folicular, Foliculogénesis, Folículos preantrales, Unidades foliculares.

Introducción

En la actualidad, algunos investigadores del campo de la reproducción han dirigido su trabajo a definir los procesos que controlan la reproducción tanto humana como animal, con el objetivo de desarrollar métodos que faciliten la manipulación *in vitro*; por ello, se han propuesto algunos modelos de crecimiento folicular *in vitro*, los cuales una vez se logren estandarizar permitirán disponer de alternativas para evaluar cada una de las etapas de la dinámica folicular y proceder a manipular las estructuras foliculares (14). Estos modelos

exigen una gran depuración técnica, en razón de la labilidad de cada uno de los componentes de la unidad folicular. Al estandarizar la técnica de desarrollo folicular *in vitro* no sólo se pretende entender el mecanismo de foliculogénesis en los estados tempranos del desarrollo, sino también comprender los mecanismos de acción de algunos factores intrínsecos involucrados en el desarrollo de los folículos maduros que finalmente pueden ovular; además, se vislumbra la posibilidad de estudiar la aplicación de medicamentos que modulen los procesos de la foliculogénesis y la dinámica folicular - reclutamiento de la cohorte, cre-

cimiento, establecimiento de la dominancia, atresia y ovulación - para poder solucionar diversas patologías de la reproducción. Finalmente, se podrían optimizar los protocolos de reproducción asistida en humanos y se desarrollaría otra alternativa biotecnológica para la reproducción animal (12, 27, 41, 42), además de disponer de cultivos *in vitro* a posteriori en situaciones que exigen la criopreservación de unidades primordiales (5, 20, 27, 31).

Desarrollo folicular

En los mamíferos las células germinales se originan del endodermo extraembrionario y migran por movimiento ameboide hacia la cavidad celómica, para alcanzar la cresta mesodérmica urogenital entre la cuarta y octava semana en el humano y el bovino (1, 49). Después de la octava y décima semanas en el humano y el bovino, la célula germinal se transforma en oogonia, la cual ha de poblar la gonada por procesos mitóticos (seis o siete divisiones) entre el tercero y el quinto mes en bovinos (39, 39), o del segundo al séptimo mes en humanos (50). Al terminar la mitosis la oogonia entra en el ciclo meiótico hasta el estado de diplotene de la profase I, donde adquiere el estado de oocito primario (46, 49). El oocito primario y una capa de células de la granulosa conforman el folículo primordial, estadio a partir del cual comienza la foliculogénesis.

En los folículos primordiales los oocitos primarios dejan su estado de latencia espontáneamente y siguen hacia otras fases de crecimiento durante las cuales coexiste la diferenciación y la proliferación del oocito y de las células que lo rodean (23), por efecto de los factores de crecimiento sintetizados en el microambiente del ovario (12, 13, 22, 43); todos estos eventos son independientes de las gonadotropinas.

En las distintas fases de la foliculogénesis en bovinos, se distinguen características que permiten identificar los folículos así (3, 26, 49):

1. Folículo primordial. Tiene un diámetro promedio en cultivo superior a 40 μ m posee un oocito de localización central cuyo diámetro es de 29.7 μ m rodeado por una sola capa de aproximadamente 10 - 15 células aplanadas y una lámina basal que constituirán la futura capa de la granulosa (3, 28, 48). A partir de este folículo se inicia el proceso de crecimiento y maduración folicular, con el fin de garantizar unidades cada vez más maduras que pueden llevar al oocito hacia la ovulación o hacia la atresia.
 2. Folículo primario. Se caracteriza porque ocurre un cambio significativo cuando las células aplanadas que rodean el oocito aumentan su tamaño hacia una forma más cuboidal, crecen hasta los 80 μ m de diámetro y se consolida como una estructura con un oocito de un diámetro superior a 31.12 μ m y una capa de 25-40 células cuboidales llamadas células de la granulosa (GC). Sobresale el aumento del volumen del oocito y la formación de la zona pelúcida (3, 26, 28, 29, 48).
 3. Folículo secundario. La transición hacia este estadio depende del estímulo de la hormona folículo estimulante, FSH (Follicle Stimulating Hormone), en donde el folículo alcanza entre 81-130 μ m de diámetro, posee de dos a siete capas rodeando el oocito, que fluctúa entre 49.5 y 68,6 μ m, para un total de 41 a 250 GC; en esta fase las GC desarrollan la capacidad de síntesis de factores de crecimiento y esteroides (2, 3, 26, 27, 29, 43, 47, 48).
- Para el caso humano, Gougeon (1996), recomienda una clasificación desde el folículo secundario hasta la ovulación, según la relación entre la formación y el crecimiento del antro folicular (23):
- a. Folículo de clase 1. Corresponde al folículo preantral temprano con un diámetro folicular de 100 μ m en promedio, en el cual se observan pequeñas cavidades del antro folicular inicial, producto de la acumulación del fluido folicular (al parecer el antro es el resultado de un proceso de apoptosis). También se presenta un gran aumento en las células de la granulosa en la región antral.
 - b. Folículo de clase 2. El diámetro del folículo aumenta hasta 180 y 250 μ m. Luego, como consecuencia de la acumulación del fluido en la cavidad antral y de la proliferación de las células de la granulosa y de la teca interna, el folículo progresa por los estadios del desarrollo clase 3 y clase 4, hasta un diámetro superior de 500 μ m (3, 23, 28, 29).
 - c. Folículos de clase 5 y 6. Corresponden a la unidad folicular dominante, producto de la selección y el establecimiento de la dominancia a partir de la cohorte reclutada inicialmente; estos folículos podrán llegar hasta la ovulación si reciben el estímulo preovulatorio de la hormona luteinizante, LH (9, 21, 22, 51).
 - d. Folículos de clase 7 y 8. Representan el final de la fase de desarrollo, cuando las células de la granulosa presentan una marcada transformación morfológica, como resultado de la modulación en la organización del citoesqueleto (23).

El objetivo de la dinámica folicular es alcanzar el estadio de folículo preovulatorio que llega al máximo nivel de maduración con un oocito capacitado para ser fecundado (12). Para la consecución de este objetivo, se requiere que en el proceso de maduración ocurra simultáneamente el desarrollo nuclear y citoplasmático (49). Los factores que regulan el proceso coordinado de maduración, depende de la acción conjunta de las gonadotropinas, los diferentes factores de crecimiento, las citoquinas, los péptidos como la inhibina y la activina, todos ellos modulados por el efecto del estradiol (8, 21, 32, 34, 35, 40).

Aislamiento y obtención de folículos preantrales

En esta década de los 90 se han empleado varias técnicas para aislar unidades foliculares, dependiendo del tipo de folículos que se quieran estudiar y de los objetivos propuestos en el ensayo (27). En los cultivos *in vitro* de folículos en el ratón se ha logrado desarrollar a partir de folículos primordiales y primarios hasta la ovulación, la fertilización (7) y el desarrollo embrionario (14, 15). Los métodos de aislamiento de los folículos preantrales del ovario, descritos por los diversos autores, pueden afectar la estructura y los componentes celulares de la unidad folicular, principalmente las células de la teca, las cuales muestran una tendencia a la degradación temprana y en consecuencia, la respuesta de las unidades foliculares es muy pobre. Por esta razón, se han tenido grandes dificultades para su aplicación en otras especies (13, 17, 18, 27, 38, 42, 48).

Entre las técnicas para aislar las unidades foliculares del ovario se resumen en esencia dos procedimientos: los enzimáticos y los mecánicos. En los enzimáticos el tratamiento se realiza con pronasa, tripsina y colagenasa (4, 12, 16, 24, 27, 35), donde la colagenasa es ideal para aislar folículos pequeños -primario y primordial, de ovario fetal en murino, debido a que se obtiene un gran número de unidades foliculares (4). La desventaja de esta técnica es la inducción del daño en algunas estructuras de la unidad folicular, las cuales van desde la remoción de la membrana basal, de las células tecales y de otras estructuras en la superficie celular, que afecta la viabilidad y sobrevivencia de las unidades foliculares.

El aislamiento mecánico presenta dos alternativas: la disección manual (3, 7, 8, 12, 13, 17, 18) y el rallado mediante el uso de utensilios tipo raspador (33,41). La

disección manual se recomienda para unidades de gran tamaño (folículos secundarios, preovulatorio), este proceso, si se realiza con precaución, puede producir menor daño en las estructuras que constituyen las unidades foliculares y se recomienda para el tejido ovárico muy fibroso, como es el caso del ovario bovino. La desventaja que presenta la técnica es la obtención de un reducido número de unidades foliculares por ovario (12, 27).

El rallado con utensilios tipo raspador, se usa para ovarios con tejido no muy fibroso, presenta un mayor número de unidades foliculares con respecto a la disección manual, pero puede generar muchas unidades con daño en la membrana basal, en las células tecales y deformaciones de la unidad por presión; no obstante, esto se puede ver compensado por el gran número de unidades obtenidas con buena morfología (27). Lo anterior plantea el uso de una apropiada combinación de las dos técnicas (mecánica y enzimática) para la disociación de unidades foliculares más pequeñas -primordiales y primarias (17, 18) que puedan alcanzar su desarrollo *in vitro* hasta el estado preovulatorio.

Aislamiento de folículos bovinos

La técnica mecánica se prefiere para separar folículos preantrales de ovarios de fetos, y de animales prepúberes y adultos bovinos. Estos métodos incluyen cortes delgados sucesivos de los ovarios en fragmentos, seguidos por el desprendimiento mecánico de los folículos pequeños por pipeteo (17, 18); y el uso de objetos tipo raspador con los cuales se liberan folículos preantrales pequeños y células diversas (33). Con estos métodos se obtienen folículos de 30 a 150 μm , es decir, folículos preantrales en crecimiento temprano (18, 32, 33).

Otros grupos han efectuado tratamientos enzimáticos con colagenasa para el aislamiento de folículos y han comparado su eficiencia con el tratamiento mecánico, y si bien se ha logrado aislar un gran número de folículos usando la enzima, la calidad del folículo se ve muy comprometida (47). En nuestro grupo de investigación se hicieron ensayos con la técnica enzimática pero no se obtuvieron resultados satisfactorios (Resultados no publicados), lo cual sugiere la existencia de grandes diferencias estructurales entre los ovarios murinos y bovinos. Algunos autores han informado el aislamiento de folículos preantrales en ratones usando colagenasa y DNasa, obtenidos con

morfología normal, de 60 – 170 μm de diámetro (4, 47). Sin embargo, en el bovino no se ha determinado ni la concentración óptima de la enzima ni el tratamiento mecánico que puede ser usado en combinación con ésta, para asegurar el aislamiento de folículos de buena calidad. Nuestro grupo se encuentra trabajando en esta línea de investigación.

El aislamiento de folículos preantrales en estados tardíos -entre 120-200 μm -, se puede lograr sólo por microdissección (3, 47) donde se obtienen alrededor de 50 a 60 folículos después de 2 a 3 horas de aislamiento (37). La microdissección no es un procedimiento adecuado para aislar folículos menores de 100 μm ni para obtener gran número de folículos, pero si asegura la calidad del folículo y es un método importante para experimentos a baja escala, diseñados para determinar las condiciones óptimas de cultivo de folículos preantrales (37).

Técnicas de selección de folículos

La selección de las unidades foliculares varía de acuerdo con el método utilizado para el aislamiento, la especie empleada como modelo y la hipótesis a probar en el ensayo (41). En el ratón, la selección se realiza mediante lavados sucesivos para eliminar la contaminación con otras células, porque el tratamiento enzimático permite obtener una población predominante de folículos preantrales con una reducción de otros tipos celulares (4, 15, 16).

En el bovino, de acuerdo con la estructura del tejido ovárico, se ha visto la necesidad de combinar técnicas mecánicas y enzimáticas, para el aislamiento de los folículos, donde se obtiene una población heterogénea de folículos y células estromales, por lo cual es necesario hacer varios lavados que reducen la cantidad y calidad de los folículos obtenidos. Los folículos primordiales y primarios de buena calidad deben tener las siguientes características: lámina basal intacta, una o dos capas de células de la granulosa y el oocito en posición central (17, 28, 47). Para mejorar la selección se han utilizado filtros y pipetas precalibradas los cuales aseguran una menor presencia de células no deseadas y cultivos más limpios.

Cultivo in vitro de folículos preantrales

En el desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* para folículos preantrales de roedores -hámster, ratones, rata

(18), se han realizado progresos significativos, que han sido posibles, gracias a la aplicación de diversos métodos y medios de cultivo, los cuales varían según el propósito para el cual fueron diseñados y por lo tanto se hace difícil su comparación.

Los medios de desarrollo y sostenimiento de los folículos cultivados *in vitro* se basan en un medio mínimo suplementado con elementos necesarios para la funcionalidad de la unidad folicular; entre los más utilizados tenemos el MEM (alfa modificado), el Waymonth MB 752/1, el Hepes 199 y el de M'Coys; este último es el que presenta el mejor resultado sin la adición de gonadotropinas, está suplementado con insulina, transferrina, selenio, glutamina, piruvato e IGF-I y se ha probado en el ratón y en otras especies con resultados similares (4, 13, 14, 17, 27). No obstante, en el modelo bovino no se han logrado los éxitos esperados.

Un sistema desarrollado en ratones por Eppig y Schroder, involucra el crecimiento de unidades individuales de complejos-oocito-cumulo en una matrix de colágeno que ha demostrado tener éxito en un gran número de oocitos, los cuales han alcanzado una progresión meiótica pudiendo ser fertilizados y llevados a un desarrollo embrionario (15, 16 y 42). Posteriormente este sistema fue adaptado al cultivo intacto de unidades foliculares preantrales en los diferentes estadios de desarrollo, que pueden sobrevivir por un período de 7 días en el bovino. Durante el cultivo se puede presentar un incremento en el tamaño del oocito, observar proliferación de las células de la granulosa y exhibir respuesta a las gonadotropinas (15, 16, 42).

La FSH es esencial para la progresión del folículo hacia los estadios preovulatorios y la LH para la organización del oocito en el proceso de maduración (4, 9, 10, 12, 32). De ahí que los autores recomiendan adicionar concentraciones de FSH superiores a 100 ng/ml con el fin de garantizar la funcionalidad en la unidad folicular; con esta concentración se disminuye la competitividad entre los folículos y se aumenta la sobrevivencia (3, 4, 7, 12). Asimismo, Tilly y Tilly (1995), recomiendan utilizar gonadotropinas IGF-I y otros factores endógenos, para disminuir el proceso de apoptosis de las unidades foliculares (45).

La LH se adiciona en el momento óptimo de la maduración folicular, con el fin de no adelantar el proceso de la luteinización (7, 12); otros investigadores sugieren la necesidad de adicionar precursores androgénicos

-androstenediona- (25). También se recomienda adicionar el Factor de crecimiento epidérmico (EGF) justo después de la formación del antro folicular, porque puede ser esencial para completar la maduración nuclear en el oocito y prepararlo para la fertilización, una vez ocurra la ovulación (7, 11, 12). Además, se presentan casos en los que se utiliza el fluido folicular para suplementar el medio (6).

El estradiol parece ser una de las hormonas más determinantes para el éxito de los cultivos *in vitro* de las células de la granulosa, en especial para la diferenciación y proliferación (25, 44). Lo anterior podría sugerir que el estradiol también sea un factor importante para el desarrollo de las unidades foliculares, dada la estrecha relación funcional entre las células de la granulosa y el oocito. El cultivo simultáneo de los folículos puede favorecer y prolongar su sobrevivencia, con lo cual se puede garantizar una mayor producción y concentración de los factores necesarios para su desarrollo (12, 42).

Perspectivas de aplicación biotecnológica

El desarrollo de sistemas de cultivos que permitan soportar el crecimiento de oocitos inmaduros hasta el estado donde ellos puedan ser madurados y fertilizados *in vitro*, permitiría entender el mecanismo de la foliculogénesis en estados tempranos del desarrollo, así como también se podría asegurar un gran abastecimiento de oocitos para la manipulación y un gran aumento en la producción de una población uniforme de animales de alta genética.

En la especie bovina, el desarrollo de la técnica de producción de folículos a partir de ovarios fetales y prepúberes, podría tener una gran repercusión en los programas de cruce y mejoramiento genético, así como una reducción en la inversión en el recurso animal como vientres, porque permitiría disponer de los gametos desde la etapa temprana fetal y evitaría la cría de la hembra donante desde su nacimiento hasta el estable-

cimiento de la edad reproductiva. En consecuencia, se podría incurrir en el ahorro en tiempo y en inversión, de casi en una generación dentro del esquema de cruzamientos.

Adicionalmente, la técnica se podría usar para acortar el intervalo generacional en programas de selección y mejoramiento genético, y para la propagación de animales en vía de extinción (48). Asimismo, en diversos estudios básicos y moleculares que permitirían esclarecer herramientas metodológicas para mejorar la eficiencia de la biotecnología de la reproducción. Por último, los cultivos se podrían usar para el estudio de diferentes agentes citotóxicos que afectan el desarrollo folicular (19, 30, 36).

Conclusiones

El beneficio potencial de utilizar folículos inmaduros de ovarios fetales o de animales prepúberes ha sido enfatizado por varios autores. El éxito del aislamiento y el desarrollo de los sistemas de cultivo *in vitro* de folículos preantrales en roedores, ha dado esperanzas para el desarrollo de sistemas similares en especies domésticas. En estas últimas, las investigaciones deberán concentrarse en el desarrollo de procedimientos de aislamiento confiables para obtener una población homogénea de folículos, y poder definir los requerimientos metabólicos para el crecimiento lento de los folículos preantrales para alcanzar el desarrollo normal del oocito hasta el estadio preovulatorio y la ovulación.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias y a la Universidad de Antioquia por la financiación de las actividades del Grupo de Teriogenología (Proyecto 1115-04-036-95; contrato 209-96) y a la Estampilla pro desarrollo de la Universidad de Antioquia, por la financiación de la investigación en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.

Summary

During the present decade the protocols for in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF) and in vitro development (IVD), have been developed in our country. The first report on in vitro rat folliculogenesis was published in 1996. Our group was encouraged to initiate the procedure for standardize the model of bovine folliculogenesis in vitro by using fetal bovine ovaries, with the aim to contribute to develop biotechnological alternatives for animal reproduction, and to have a model in

vitro in which medical compounds with potential use in animal reproduction could be evaluated, previous to its application in *in vivo* studies. In this paper we present a critical review about the information concerning the field of bovine *in vitro* follicular development; in addition, some areas of research are proposed in which the model could be useful for basic and clinical research.

Key words: Bovine, Follicular dynamics, Folliculogenesis, Preantral follicles.

Referencias

- Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cell in human ovaries. Proc Real London Biol 1963; 158:417.
- Brännström M, Mikuni M, Hedin L. Intra- ovarian events during follicular development and ovulation. Hum Reprod 1997; 12:51-57.
- Braw R, Yossefi S. Studies In Vivo and *In vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J Reprod Fertil 1997; 109:165-171.
- Cain L, Chatterjee S, Collins T. *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. Endocrinology 1995; 136:3369-3377.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocyte from frozen primary follicle. J Reprod Fert 1990; 90:321-327.
- Carolan C, Lonergan P, Monget P, Monniaux D, Mermillod P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocyte. Mol Reprod Develop 1996; 43:477-483.
- Cortvrindt R, Smits, Van Sterteghem. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocyte from early preantral follicle from prepuberal mice in a simplified culture system. Human Reprod 1996; 12:2656-2666.
- Cortvrindt R, Smits, Van Sterteghem. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. Hum Reprod 1997; 12:759-768.
- Chapel SC and Howles C. reevaluation of role of luteinizing, hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. Hum Reprod 1991; 6:1206-1212.
- Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafirri A, Hsurh AJW. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles; mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. Endocrino 1994; 135: 1845-1853.
- Dekel N, Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocyte. Endocrinology 1985; 116:406-409.
- Eppig JJ, O'Brien, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. Mol Reprod Develop 1996; 44: 260-273.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod 1996; 54: 197-207.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development *in vitro* and *in vivo*. Theriogenology 1998; 49:415-422.
- Eppig JJ, Schoeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. Biol Reprod 1989; 41: 268-276.
- Eppig JJ, Telfer EE. Isolation and culture of oocytes. Methods Enzymol 1993; 225: 77-84.
- Figueiredo JR, Hushof CJ, van Denhunk. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles culture *in vitro*. Theriogenology 1994; 41: 1333-1346.
- Figuereido JR, Hulshof SCJ, Van den Hurk R, Bevers MM, Nusgens B, Beckers JF. Development of a new mechanical method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. Theriogenology 1993; 40: 789-799.
- Flaws JA, Salyers KL, Sipes IG, Hoyer PB. Reproductive ability of rat preantral ovarian follicle for metabolize 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide *in vitro*. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 126:286-294.
- Fortune JE, Kitos, Wandji SA and Snen. Activation of bovine and baboon primordial follicles *In Vitro*. Theriogenology 1998; 49:441-449.
- Gore RE, Langton and Armstrong T. Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil AN, Neill(Eds). The physiology of reproduction. Second edition. Raven Press. Philadelphia. 1994; 1:571-628.
- Greenwal GS, Roy SK. Follicular development and its control. En: Knobil AN, Neill(Eds). The physiology of reproduction. Second edition. Raven Press. Philadelphia. 1994; 1:629-724.
- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primate: Factors and hypotheses. Endocrine Rev 1996; 17: 121-155.
- Grob HS. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. Science 1964; 146: 73-74.

25. Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod* 1997; 56:608-616.
26. Hafez ESG. Foliculogénesis, maduración del óvulo y la ovulación. En: *Reproducción e inseminación en animales*. 3ª ed. Interamericana- McGraw Hill. México, 1996: 108-137.
27. Hartshorne B. *in vitro* culture of ovarian follicles. *Rev Reprod* 1997; 2:94-104.
28. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124:43-101.
29. Hirshfield AN. Granulosa cell proliferation in very small follicle of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 1989; 41:309-316.
30. Hirshfield AN. Overview of ovarian follicular development. *Environ Mol Mutag* 1997; 29:10-15.
31. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RLM. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reprod* 1997; 12:1032-1036.
32. Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Van der Donk JA, Van den Hurk R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology* 1995; 44: 217-226.
33. Jewgenow K, Pitra C. A method for isolation of preantral follicles from cattle ovaries. *Reprod Dom Anim* 1991; 6: 281-289.
34. 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* 1998; 139:2342-2347.
35. Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicle *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1992; 95:349-362.
36. Nayudu PL, Kiesel PS, Nowshari MA, Hodges JK. Abnormal *in vitro* development of ovarian follicle explained from mice exposed to tetrachlorvinphos. *Reprod Toxicol* 1994; 8:261-268.
37. Ralph JH, Wilmut I, Telfer EE. *In vitro* growth of bovine preantral follicles and the influence of FSH on follicular and oocyte diameters. *J Reprod Fert* 1995; abstract series 15:6.
38. Roy SK, Treacy BS. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril* 1993; 59:783-790.
39. Russe I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 1983; 24:77-92.
40. Smits J, Cortvriendt R, Hu Y. Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle enclosed oocyte culture. *Hum Reprod* 1998; 13:664-669.
41. Telfer EE. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology* 1996; 45: 101-110.
42. Telfer EE. *In vitro* model for oocyte development. *Theriogenology* 1998; 49: 451-460.
43. Terranova PF. Regulation of the granulosa cell: growth factor interaction. *Semin Reprod Endocrinol* 1991; 9:313-320.
44. Tesarik J, Mendoza C. Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metabol* 1995; 80:14378-1443.
45. Tilly JL and Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle stimulating hormone to suppress apoptosis in culture rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995; 136:242-252.
46. Tsafire A, Dekel N. Molecular mechanisms in ovulation. En: *Molecular biology of the female reproductive system*. 1994; 204-259.
47. Wandji SA, Srsen V, Voss A, Eppig JJ. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 55: 942-948.
48. Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Hum Reprod* 1997; 12: 1993-2001.
49. Wassarman PM, Albertini DF. Mammalian ovum. En: Knobil AN, Neil (Eds). *The physiology of reproduction*. Second edition. Raven Press. Philadelphia. 1994; 1:79-121.
50. Woolums AR, Peter AT. Cystic ovarian condition in cattle. Part I. Folliculogenesis and ovulation. *Comp Cont Educ* 1994; 16:935-942.
51. Zeev S, Howard S, Vaclav I. Luteinizing hormone: its role, mechanism of action, and detrimental effect when hypersecreted during the follicular phase. *Fertil Steril* 1993; 59: 1153-1161.