

Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos

Oogenesis and Folliculogenesis in Mammals

Paulo Roberto Adona^{ab*}; Paulo Sérgio Monzani^{ab}; Samuel Guemra^{ab}; Moyses dos Santos Miranda^c; Otavio Mítio Ohashi^c

^aUniversidade Norte do Paraná PR, Brasil

^bAgropecuária Laffranchi, PR, Brasil

^cUniversidade Federal do Pará, PA, Brasil

*E-mail: paulo_adona@yahoo.com.br

Recebido: 31 de maio de 2012; Aceito: 02 de outubro de 2012

Resumo

Os ovários são órgãos sexuais femininos que tem como principais funções a gametogênese e a esteroidogênese. A gametogênese caracteriza-se pela produção de células reprodutivas femininas ou óvulos e a esteroidogênese pela produção de hormônios esteróides. Em especial nos ruminantes, a formação dos gametas femininos e dos folículos ovarianos é iniciada no período pré-natal. Esta revisão destaca os principais processos morfofisiológicos envolvidos na ovogênese e na foliculogênese. A ovogênese pode ser definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais até a formação do óvulo e sua fecundação. Já a foliculogênese inclui a unidade morfofuncional do ovário que desempenha a função de produção de hormônios esteróides e a de manutenção da viabilidade do óvulo até a ovulação. Com o crescente avanço das biotécnicas de reprodução assistida, a compreensão das funções da ovogênese e foliculogênese é essencial para eficiência reprodutiva dos animais e para obtenção de descendentes viáveis a partir de ovócitos cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: Foliculo Ovariano. Mamíferos. Ovulação.

Abstract

The ovaries are the female sexual organs whose main functions are the gametogenesis and steroidogenesis. Gametogenesis is characterized by the production of female reproductive cells or ova, and steroidogenesis by the production of steroid hormones. Especially in ruminants, the formation of female gametes and ovarian follicles is initiated in the prenatal period. This review highlights the main morphophysiological processes involved in oogenesis and folliculogenesis. Oogenesis can be defined as the set of processes covering the development and differentiation of primordial germ cells until the formation of the egg and its fertilization. On the other hand, folliculogenesis includes morphofunctional unit of the ovary that serves as the production of steroid hormones and maintenance of the viability of the egg until ovulation. With an increasing breakthrough of biotechnical assisted reproductive functions, understanding of oogenesis and folliculogenesis is essential for reproductive efficiency of animals and for obtaining viable offspring from oocytes cultured *in vitro*.

Keywords: Ovarian Follicle. Mammals. Ovulation.

1 Introdução

A ovogênese refere-se à sequência de eventos em que as células germinativas primordiais diferenciam-se inicialmente em ovogônias, seguindo para ovócitos primários e posteriormente secundários, quando ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar. O processo é finalizado com a fecundação do ovócito maturo e a liberação do segundo corpúsculo polar. O evento da foliculogênese inicia-se com a formação dos folículos primordiais, que progridem para primários, secundários, terciários, pré-ovulatórios e finaliza com a ovulação de um ovócito maturo, neste caso da espécie bovina (Figura 1). Este estudo tem por finalidade destacar os principais processos morfofisiológicos envolvidos na ovogênese e na foliculogênese.



Figura 1: Diagrama simplificado da ovogênese e foliculogênese^{2,14}.

2 Desenvolvimento

2.1 Métodos

A revisão da literatura foi baseada em pesquisa na base de dados PubMed, SciELO e Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo - USP, utilizando as palavras-chave “Foliculogênese”, “ovogênese”, “foliculos ovarianos”, “células germinativas primordiais” e “gametas femininos” e selecionando, entre os artigos encontrados, aqueles que correlacionavam com o artigo ovogênese e foliculogênese em mamíferos.

A diferenciação das células da linhagem germinativa feminina ocorre totalmente, ou quase totalmente, na fase embrionária, dependendo da espécie^{1,2}. As células germinativas primordiais (2n) migram para as gônadas femininas (ovário), onde iniciam o processo de diferenciação para ovogônias (2n). Estas células apresentam intensa proliferação através da divisão mitótica, mantendo-se diploides^{2,3}. Ainda na fase embrionária, estas células iniciam o processo de diferenciação para ovócitos primários (2n), dando início ao processo meiótico com a duplicação do DNA; esse estágio da divisão celular é interrompido antes de completar a prófase da primeira das duas divisões meióticas que caracterizam o processo^{1,3,4}.

Ao nascerem, os bovinos dispõem de determinado número de ovócitos primários, cada qual com o material genético duplicado². O processo de diferenciação dos ovócitos primários para secundários é iniciado na maturidade sexual, quando um ovócito (2n = 60 cromossomos já duplicados) conclui a primeira meiose iniciada na fase fetal; na espécie bovina, este processo ocorre em intervalos médios de 21 dias. Nesta fase, o ovócito secundário (n = 30 cromossomos duplicados) encontra-se apto para fecundação. Após a fusão com o espermatozóide, o ovócito finaliza sua segunda divisão meiótica (n = 30 cromossomos simples). O material genético do ovócito é reduzido à metade por meio de duas divisões meióticas sucessivas. A ploidia celular retorna à sua conformação original (2n) após a fecundação do ovócito com a interação (singamia) dos pronúcleos masculino e feminino, formando o zigoto que originará o embrião^{1,2,5}.

2.2 Formação do ovócito

Nos vertebrados, as células germinativas primordiais dão origem aos gametas e são caracterizadas por sua forma oval ou redonda, com contorno irregular e grande núcleo com nucléolos proeminentes⁶. As avaliações realizadas por ultraestrutura mostraram que estas células contêm, no citoplasma, ribossomos, mitocôndrias, grânulos de glicogênio, gotículas de lipídio em grande quantidade e retículo endoplasmático e complexo de Golgi pouco desenvolvidos⁷⁻⁹.

Estas células diferenciam-se em ovogônias, que por sua vez dão origem a todos os ovócitos da gônada feminina. A população de ovogônias tem um número predeterminado de divisões mitóticas, espécie-específica. No fim do ciclo de

divisões mitóticas, as ovogônias aumentam de tamanho e entram em prófase I na primeira meiose, diferenciando-se, assim, como ovócitos primários^{1,10}. A prófase da primeira meiose é dividida em cinco estágios sequenciais: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Porém, o processo meiótico no ovócito é interrompido ainda no estágio na prófase I, antes de completar o estágio de diplóteno, também denominado de dictióteno. O ovócito permanece neste estágio da divisão celular até o início da maturação ovocitária no período da maturidade sexual. Em bovinos, a formação dos ovócitos primários ocorre entre 75 e 80 dias (Tabela 1) após a concepção^{2,11,12}.

Tabela 1: Cronologia dos eventos da ovogênese e foliculogênese durante a gestação em bovino e ovino^{2,4,11}

Eventos	Dias de gestação	
	Bovino	Ovino
Células germinativas primordiais	35	23
Ovogônias	60	48
Ovócitos primários	75-80	55
Foliculos primordiais	90-130	90
Foliculos primários	140	95
Foliculos secundários	210	103
Foliculos terciários	230-250	150
Nascimento	280	150

Estudos em fetos de ovinos mostram que as ovogônias e os ovócitos começam o crescimento antes, durante e após a formação dos foliculos¹¹⁻¹³ e que o número de ovócitos inclusos nos foliculos primordiais diminuem por degeneração, próximo ao nascimento e sob circunstâncias normais¹⁴. Entretanto, o ovário possui células germinativas mitoticamente ativas que sustentam a formação de novos ovócitos e foliculos. Bukovsky *et al.*¹⁵ demonstraram que, em mamíferos, células germinativas primordiais originam a partir de precursores de células somáticas e os ovários de mulheres adultas possuem componentes para a formação de novas células germinativas e foliculos primordiais. Essas novas células diferenciam-se sequencialmente a partir das células progenitoras mesenquimais, que se localizam na túnica albugínea ovariana. A formação de novos foliculos ovarianos durante todo o período reprodutivo pode compensar a atresia de uma parcela significativa do *pool* folicular e pode assegurar a preservação do número constante de foliculos.

2.3 Formação dos foliculos

Na transição da mitose para meiose as ovogônias transformam-se em ovócitos primários e foliculos primordiais ao redor do ovócito, com uma camada de 4 a 8 células somáticas, chamadas pré-granulosas e uma lâmina basal formando a primeira categoria de foliculo, denominado foliculo primordial^{4,16}.

Na maioria das espécies investigadas, as células da granulosa dos folículos primordiais podem ser originadas das células mesoteliais ou das células mesonéfricas, ou ainda de ambas as células^{4,14,17}. Os folículos primordiais estão localizados na região periférica do córtex ovariano e apresentam dois formatos de células da granulosa: pavimentoso e cúbico¹⁸. Os folículos primordiais, primários e secundários (Tabela 1) aparecem por volta de 90, 140 e 210 dias no ovário fetal de bovino, respectivamente^{2,4}. Os folículos permanecem quiescentes nos ovários até o recrutamento e o crescimento de um *pool* de folículos primordiais da população ovariana. Diariamente, um grupo desses folículos é recrutado do estoque de folículos primordiais. Estudos morfométricos sugerem que o crescimento dos folículos é baseado na ordem em que são formados¹⁹. Consequentemente, os folículos primordiais transformam-se em folículos primários de acordo com a ordem de formação, e essa transformação pode acontecer após alguns dias, anos ou décadas, dependendo da espécie¹⁴.

A classificação em folículos primários se dá quando uma única camada de células da granulosa, com formato cuboide, cerca o ovócito. A transição de folículos primordiais para folículos primários é realizada através de um processo de maturação muito lento, visto que o diâmetro do ovócito muda lentamente^{20,21}. A progressão do folículo ao estágio secundário é caracterizada pela formação da segunda camada de células da granulosa e pela deposição inicial do material da zona pelúcida em torno do ovócito, que aumenta de tamanho^{4,22-25}.

Os folículos ovarianos são classificados, em termos gerais, em pré-antrais e antrais. Os folículos pré-antrais são constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários e são diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células da granulosa que circunda o ovócito^{2,4}. Por outro lado, os folículos antrais são aqueles que apresentam cavidade antral, ou seja, presença de líquido folicular, também denominados folículos terciários, pré-ovulatórios ou folículo de Graaf^{2,21,25,26}.

2.4 Formação da zona pelúcida

O fator da linha germinativa alfa (FIG α) e o fator de transcrição E12 são responsáveis pela ativação da expressão de três genes ovócito-específicos que, dependendo da espécie, podem ser expressos pelo ovócito, células da granulosa, ovócito/granulosa ou pelo ovário e vão induzir a transcrição das glicoproteínas extracelulares (ZP1, ZP2 e ZP3), as quais constituem a zona pelúcida. Esta estrutura é um revestimento protetor situado em torno do ovócito, com múltiplas funções, sendo essencial para o desenvolvimento normal do folículo²⁷⁻³⁰. A zona pelúcida é formada no decorrer do desenvolvimento foliculo/ovócito, a partir da formação dos folículos primordiais^{2,22-24}.

2.5 Fatores envolvidos nos folículos pré-antrais pequenos

A ativação do crescimento dos folículos em bovinos é caracterizada pela aquisição de uma camada completa de 11 a 20 células cubóides da granulosa, em torno do ovócito⁴. Na

transição de folículos primordiais até secundários, os fatores derivados dos ovócitos (Ex.: Activina, Proteína morfogenética óssea-15, Fatores de crescimento de fibroblasto, epidermal, diferencial-9 e semelhante à insulina-1) e das células da granulosa (Ex.: Neurotrofina-4, Andrógenos, Fator esteroideogênico-1, Fator de crescimento neural, semelhante à insulina-1 e epidermal) são responsáveis pela indução ou inibição do desenvolvimento dos folículos/ovócitos. Os mecanismos responsáveis pelo crescimento dos ovócitos/folículos pré-antrais são ainda pouco conhecidos^{4,11,12,14}.

A primeira função dos fatores de transcrição derivados do ovócito parece ser de coordenar o desenvolvimento do folículo primordial. A influência do ovócito nas células da granulosa dos folículos pré-antrais pode estabelecer o programa para o desenvolvimento dos folículos antrais, à medida que os hormônios gonadotróficos exercem seus efeitos mais decisivos sobre os folículos³¹.

O fator de crescimento dos nervos (NGF) faz parte da família de proteínas das neurotrofinas (NT-3/4/5), que estão envolvidas na sobrevivência e diferenciação dos neurônios no sistema nervoso central e periférico. A síntese de NGF nas células da granulosa sugere outra função para as proteínas neurotrofinas no sistema endócrino reprodutivo. O NGF está envolvido no crescimento dos folículos primordiais, independentemente das gonadotrofinas pituitárias³². A expressão do receptor do hormônio foliculo estimulante (FSHr) parece ser iniciada a partir dos folículos primários, os quais são responsivos ao FSH, embora os receptores do FSH sejam variáveis neste estágio de desenvolvimento^{18,33}.

A expressão do NGF (NT-4) nas células da granulosa tem ação regulatória no desenvolvimento dos ovócitos de mamíferos, por atuarem nos receptores da tirosina cinase B, bem como no desenvolvimento do estroma ovariano, através da interação com o receptor de neurotrofinas p75^{14,34}. O silenciamento do gene que codifica o NGF resulta na deficiência do desenvolvimento do ovário, redução do número de folículos e aumento de ovócitos desnudos. O NGF também pode atuar nas células da teca que expressam os receptores tirosina cinase A, aumentando sua proliferação horas antes da ovulação^{32,35}.

2.6 Fatores envolvidos nos folículos secundários e antrais

Fatores que influenciam o desenvolvimento dos folículos secundários e terciários podem ser derivados dos ovócitos (Ex.: Proteína morfogenética óssea-15, Fator de crescimento diferencial-9 e Conexina-37), das células da granulosa (Ex.: Fator de crescimento epidermal, Activina, Folistatina, Inibina) e das células da teca (Ex.: Fator de crescimento epidermal, Proteínas morfogenética óssea e Fator de crescimento semelhante a insulina II)¹⁴.

Os folículos secundários são responsivos aos hormônios gonadotróficos e podem progredir para o estágio seguinte do desenvolvimento (antral), com uma circulação mínima de FSH, mas o hormônio luteinizante (LH) parece ser mais

importante para o crescimento dos folículos neste estágio do desenvolvimento, provavelmente porque as células da granulosa apresentam receptores para FSH pouco funcionais. Assim, através dos receptores de LH nas células da teca, o hormônio desencadeia o processo de biossíntese de andrógenos tecais que podem estimular a formação de novos receptores de FSH nas células da granulosa. Deste modo o FSH pode amplificar seu efeito sobre os folículos secundários^{14,36,37}.

Os folículos antrais são caracterizados pela formação de uma cavidade, o antro, que acumula líquido folicular no interior das multicamadas de células da granulosa. A produção deste líquido folicular é intensificada com o aumento do tamanho dos folículos. Esse líquido serve como fonte importante de moléculas reguladoras, como as gonadotrofinas, os esteróides, os fatores de crescimento, as enzimas, as proteoglicanas e as lipoproteínas que são derivadas do sangue e das células que integram o folículo¹⁴.

Os sinais para a formação do antro não são bem compreendidos, no entanto, tem sido demonstrado que o FSH e os fatores de crescimento epidérmico semelhante à insulina tipo 1 promovem a formação do antro em folículos cultivados *in vitro*, os quais apresentam multicamadas de células da granulosa^{38,39}. O crescimento dos folículos antrais em bovinos ocorre em duas fases distintas: a) fase lenta: os folículos demoram aproximadamente 30 dias para avançar de 0,3 mm de diâmetro para o estágio de pequenos folículos antrais, com cerca de 3 mm de diâmetro⁴⁰. Neste período do crescimento folicular, o ovócito atinge seu crescimento final, com aproximadamente 110 µm de diâmetro, o que está relacionado com a aquisição da competência para o desenvolvimento^{22,25}; b) fase rápida: os folículos pequenos, de aproximadamente 3 mm de diâmetro, demoram de 5 a 7 dias para se tornar folículos dominantes, com mais de 8 mm de diâmetro. Esta fase é seguida por um período variável de dominância, que culmina no desenvolvimento do folículo pré-ovulatório e, em seguida, na ovulação^{40,41}.

Sumarizando, o desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pela fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância do folículo pré-ovulatório. Os ciclos de recrutamento ocorrem em ondas e são acompanhados da seleção dos folículos antrais, variando entre animais e de acordo com a espécie¹⁴. Quando os folículos bovinos atingem um diâmetro de aproximadamente 8 mm, é iniciada a seleção dos folículos antrais e o desenvolvimento dos receptores para LH nas células da granulosa. Dependendo da raça e sob a influência do LH, apesar da diminuição das concentrações de FSH, os folículos aumentam de tamanho rapidamente, tornando-se maiores que os outros folículos, podendo chegar a aproximadamente 15 mm de diâmetro no estágio de folículo ovulatório^{14,41-43}.

2.7 Maturação ovocitária

Na espécie bovina, *in vivo* a meiose é reiniciada com o surgimento do pico de LH, ocorrendo somente nos ovócitos meioticamente competentes dos folículos pré-ovulatórios^{4,25}.

A competência dos ovócitos tem uma estreita relação com as multicamadas de células do cumulus que são linhagens de células da granulosa, as quais envolvem os ovócitos, mantendo uma importante via de comunicação através das junções comunicantes GAP (*gap junctions*), antes e durante o pico de LH^{25,44}. Logo após o pico, ocorre o desaparecimento dessas vias de comunicação entre o ovócito e as células do cumulus²⁴.

A progressão do ovócito até o estágio de metáfase da segunda meiose é marcada por uma série de transformações no núcleo e no citoplasma do ovócito, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estes eventos caracterizam a maturação ovocitária. Na transição entre prófase I e metáfase II, ocorre uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações, envolvendo uma série de proteínas que participam do reinício e da regulação da meiose na maturação do ovócito. Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as do fator promotor da maturação (MPF) e as proteínas cinase, ativadas por mitogenos (MAPK).

O MPF é o principal regulador das alterações morfológicas durante a maturação, como a condensação dos cromossomos, rompimento do envelope nuclear e organização das organelas citoplasmáticas com a participação das proteínas MAPK⁴⁵⁻⁴⁷. A via MAPK é ativada universalmente durante a maturação em ovócitos de vertebrados. Entretanto, o tempo requerido para sua ativação é dispar nas diferentes espécies⁴⁸.

2.8 Ovulação

Os folículos dominantes são caracterizados por uma rede vascular elaborada. Essas finas redes de capilares estão localizadas entre as camadas das células da teca dos folículos pré-ovulatórios, chegando próximo às camadas das células da granulosa. Os nutrientes e hormônios são fornecidos por difusão em um fluxo bidirecional entre as células da granulosa e a rede de capilares. O aumento do fluxo de sangue para as camadas das células da teca do folículo dominante resulta no aumento sistêmico do suprimento de hormônios gonadotróficos, fatores hormonais e bioquímicos, necessários para o desenvolvimento e ovulação do folículo^{41,49}. A ovulação ocorre em consequência de uma interação dinâmica entre o pico pré-ovulatório causado pelo LH e os fatores locais, incluindo os esteróides. O pico de LH provoca mudanças estruturais e bioquímicas, que conduzem à ruptura do folículo ovulatório, tendo, como resultado, a extrusão do ovócito maduro e o desenvolvimento subsequente do corpo lúteo. As fibras de colágeno contidas na túnica albugínea, nas camadas das células da teca e na membrana basal contribuem para elasticidade e resistência da parede folicular. A degradação das camadas de colágeno é acompanhada pela dilatação e permeabilidade vascular aumentada, que são necessárias para a ruptura folicular^{41,49}. Outro processo induzido pelo LH que culmina na ovulação é a expansão das células do cumulus por meio da secreção do hialuronano (ácido hialurônico), que forma um muco elástico na matriz extracelular¹⁴. Esta estrutura

da matriz é importante para a extrusão do ovócito do folículo ovulatório e para a captura do ovócito pelas fimbrias⁵⁰.

Apesar dos efeitos estimuladores intensos produzidos pelo LH, as células do cumulus e o ovócito expressam pouco ou nenhum receptor para este hormônio, sendo, portanto, insensíveis à sua estimulação direta do LH. A ação do LH parece ser mediada por proteínas relacionadas com o EGF, que são capazes de propagar o estímulo do LH através das vias autócrina e parácrina⁵¹.

3 Conclusão

Esta revisão enfoca os principais processos morfofisiológicos envolvidos na ovogênese e na foliculogênese. A compreensão destes pode ser aplicada em aprimoramentos das biotecnologias da reprodução assistida, aumentando a eficiência dos resultados ou abrindo caminho para diagnósticos e/ou terapias.

Referências

- Moore KL, Persaud TVN. Embriologia Basica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Roca; 2008.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed; 2010.
- Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Anim Reprod Sci 2003;78(3/4):203-16.
- Hafez ESE, Hafez B. Reprodução animal. Barueri: Manole; 2004.
- Soto-Suazo M, Zorn TM. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. Anim Reprod 2005;2(3):147-60.
- Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. Anat Rec 1977;188(3):315-30.
- Moens A, Fléchon B, Degrouard J, Vignon X, Ding J, Fléchon JE, *et al.* Ultrastructural and immunocytochemical analysis of diploid germ cells isolated from fetal rabbit gonads. Zygote 1997;5(1):47-60.
- Yoshinaga K, Nakamura M, Ukeshima A. Ultrastructural characteristics of primordial germ cells in the quail embryo. Anat Rec 1993;236(3):547-52.
- Moniruzzaman M, Miyano T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. J Reprod Dev 2010;56(6):559-66.
- McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, *et al.* Control of early ovarian follicular development. J Reprod Fertil 1999;54:3-16.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, *et al.* Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. Mol Cell Endocrinol 2000;163(1/2):11-20.
- Smith P, O WS, Corrigan KA, Smith T, Lundy T, Davis GH, McNatty KP. Ovarian morphology and endocrine characteristics of female sheep fetuses that are heterozygous or homozygous for the inverdale prolificacy gene (*fecX1*). Biol Reprod 1997;57(5):1183-92.
- Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenol 2005;63(6):1717-51.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala ME, Dominguez R. Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. Endocrine 2005;26(3):301-16.
- Van Wezel IL, Rodgers RJ. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. Biol Reprod 1996;55(5):1003-11.
- Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. Biol Reprod 2002;66(4):1134-50.
- Van den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF. *In-vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. Theriogenol 1997;47(1):73-82.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol 1991;124:43-101.
- Hirshfield AN. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. Biol Reprod 1991;44(6):1157-62.
- Salha O, Abusheikha N, Sharma V. Dynamics of human follicular growth and *in-vitro* oocyte maturation. Hum Reprod Update 1998;4(6):816-32.
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. Mol Reprod Dev 1997;46(2):208-15.
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. Anat Embryol (Berl) 1997;195(4):327-36.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenol 1997;47(1):23-32.
- Rodriguez KF, Farin CE. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. Reprod Fertil Dev 2004;16(1/2):55-67.
- van den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. Hum Reprod Update 2000;6(5):457-74.
- Rankin T, Soyol S, Dean J. The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. Mol Cell Endocrinol 2000;163(1/2):21-5.
- Rankin T, Dean J. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. Rev Reprod 2000;5(2):114-21.
- Soyol SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. Development 2000;127(21):4645-54.
- Huntriss J, Gosden R, Hinkins M, Oliver B, Miller D, Rutherford AJ, *et al.* Isolation, characterization and expression of the human Factor In the Germline alpha (FIGLA) gene in ovarian follicles and oocytes. Mol Hum Reprod 2002;8(12):1087-95.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proc Natl Acad Sci 2002;99(5):2890-4.
- Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. Endocrinol 2001;142:2078-86.
- Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. J Clin Endocrinol Metab 1997;82(11):3748-51.
- Anderson RA, Robinson LL, Brooks J, Spears N. Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(2):890-7.
- Dissen GA, Parrott JA, Skinner MK, Hill DF, Costa

- ME, Ojeda SR. Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinol* 2000;141(12):4736-50.
36. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000;21(2):200-14.
37. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 2010;140:489-504.
38. 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* 2000;62(5):1322-8.
39. Hillier SG. Paracrine support of ovarian Stimulation. *Mol Hum Reprod* 2009;15:(12)843-50.
40. Mihm M, Bleach EC. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78(3/4):217-37.
41. Bleach EC, Glencross RG, Feist SA, Groome NP, Knight PG. Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol Reprod* 2001;64(3):743-52.
42. Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenol* 2001;55(6):1211-39.
43. Santiago LL, Torres CAA, Nogueira ET. Folículo dominante e resposta super-ovulatória em novilhas da raça Nelore. *Rev Bras Zootecn* 2002;31:363-8.
44. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004;82/83:431-46.
45. Kano F, Takenaka K, Yamamoto A, Nagayama K, Nishida E, Murata M. MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic Xenopus extracts. *J Cell Biol* 2000;149:357-68.
46. Kubelka M, Anger M, Kalous J, Schultz RM, Motlík J. Chromosome condensation in pig oocytes: lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. *Mol Reprod Dev* 2002;63(1):110-8.
47. Lefebvre C, Terret ME, Djiane A, Rassinier P, Maro B, Verlhac MH. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol* 2002;157(4):603-13.
48. Nebreda AR, Ferby I. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12(6):666-75.
49. Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:127-40.
50. Talbot P, Shur BD, Myles DG. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2003;68(1):1-9.
51. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Sci* 2004;303(5658):682-4.