

## NUEVOS CONCEPTOS EN FOLÍCULOGÉNESIS

**K.C. Silva-Santos, G.M. Gomes dos Santos, L. S. Rafagnin M., M. M. Seneda**

*Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina*

*Londrina, Paraná 86051-990 Fone (43) 3371-4064 fax (43) 3371-4063*

*E-mail: mseneda@uel.br*

### **Introducción.**

El interés en folículoogénesis ha aumentado significativamente en los últimos años. Varias razones pueden explicar este crecimiento. En el contexto aplicado, la industria de producción de embriones in vitro ha aumentado espectacularmente en todo el mundo, especialmente en Brasil. De la misma manera, el inseminación artificial con tiempo programado ha sido ampliamente utilizado, debido a sus beneficios en la cría de animales. Sin embargo, varios aspectos de la fisiología folicular siguen siendo desconocidos, en particular en la raza Nelore (*Bos indicus*), el más importante raza de ganado en Brasil. Para la investigación básica, la cultura in vitro folículos pre-antrales se ha convertido en un modelo muy útil, ampliando las posibilidades de una mejor comprensión de la regulación folicular. Nuevas teorías se han presentado en la formación folicular, con interesantes debates sobre el origen del folículo y los mecanismos implicados en el reclutamiento y el crecimiento de folículos. Por último, las nuevas áreas de conocimiento, como la epigenética, empezando nuevas perspectivas para mejorar nuestra comprensión de la fisiología ovárica.

En este trabajo se revisan brevemente las bases de folículoogénesis, según los últimos resultados de la investigación científica. Después, se discute la nueva hipótesis relativa a la producción de ovocitos en hembras adultas. Finalmente, vamos introducir nuevos estudios sobre el crecimiento folicular y la epigenética.

### **Conceptos importantes en folículoogénesis**

En los mamíferos, folículoogénesis se inicia en la vida fetal. Células germinales primordiales del saco vitelínico migran a las gónadas en formación. Estas células germinales se multiplican por mitosis y grupos de oogonias se forman, conectadas entre sí por interacciones citoplásmicas. En esta etapa, oogonias están rodeados de células somáticas en el mesonephro, formando los cordones corticales que son precursores de folículos primordiales.

El oogonias se va diferenciar en ovocitos, que formarán folículos primordiales cuando se asocia con las células de la granulosa. Los ovocitos luego inician las divisiones de la meiosis, pero hay una interrupción a la profase de meiosis I, en la etapa diploteno. Esta interrupción dura hasta que el folículo sea activado, durante lo período de actividad reproductiva empezando en la pubertad (Soto-Suazo y Zorn, 2005; Van den Hurk y Zhao, 2005).

Coincidiendo con el inicio de la meiosis, folículos primordiales son individualizados de cordones corticales y que se caracterizan por el ovocito rodeado de una sola capa de células granulosa planas. Un elevado número de folículos se degeneran en esta etapa y el resto de folículos serán la reserva folicular del ovario. Después de la creación de la reserva folicular, un número de folículos se someten a la activación, al parecer, de acuerdo con la cronología de su formación. Este proceso de activación dura para toda la vida reproductiva (Van den Hurk y Zhao, 2005).

El reclutamiento folicular no es totalmente conocido. Es relativamente bien aceptado un predominio de los factores locales que actúan en el comienzo del crecimiento folicular, como ligando Kit (KL - Parrot & Skinner, 1999), GDF-9 (Vitt *et al.*, 2000), bFGF (Nilsson *et al.*, 2001) y LIF (Nilsson *et al.*, 2002).

Desde su activación, el folículo primordial se convierte en folículo primario que presenta las células de la granulosa en una forma de cubos. El ovocito parece que sólo se someten a un proceso de maduración de base, ya que su tamaño no cambia significativamente. Una modificación notable es el surgimiento de la zona pelúcida, una estructura presente entre el ovocito y las células de la granulosa a lo largo de todo el crecimiento folicular. Las variaciones genéticas en las proteínas de zona pelúcida

se asoció con resultados poco satisfactorios en la fecundación in vitro, destacando la importancia de una evaluación precisa de esta estructura en los ovocitos (Mannikko *et al.*, 2005).

Folículos secundarios presentan un ovocito más grande, un bien desarrollado zona pelúcida, y por lo menos dos capas de células granulosa. Durante la formación de los folículos secundarios, algunos marcadores se ha informado, como activin-A (Zhao *et al.*, 2001), EGF (Gutiérrez *et al.*, 2000) y BMP-15 (Juengel *et al.*, 2002). Al final de esta etapa, el papel desempeñado por las gonadotropinas puede ser detectado y las importantes acciones de FSH y LH se inician. Algunos marcadores, como Activina y su proteína de unión - Pholistatina - se han identificado de primordial a los grandes folículos antral (Silva *et al.*, 2004).

La siguiente etapa es el folículo terciario, que presenta varias capas de células granulosa y el inicio de la formación del antro. FSH ha sido considerada como un factor esencial, debido a sus funciones endocrinas y paracrinas. Por ejemplo, la FSH hace una asociación con la modulación del familia FGF, como el FGF-8 (Buratini *et al.*, 2005). Después de esto, un acontecimiento muy importante se pueden distinguir: la formación del antro, lo que representa un notable paso de crecimiento folicular. El desviación y dominancia folicular san modificaciones cruciales en este momento y aspectos importantes acerca de LH y su receptor se han descrito en esta etapa (Nogueira *et al.*, 2007). La presencia de líquido folicular permite las evaluaciones ecográficas, un método esencial para los estudios in vivo, hasta el destino final del folículo: atresia o la ovulación.

### ¿Producción permanente de ovocitos?

Como se describe en el punto anterior, los aspectos finitos y no renovables de abastecimiento de las células germinales de ovario son considerados como una premisa básica de la fisiología de la reproducción. La disminución gradual del número de ovocitos se produce principalmente debido a los mecanismos de apoptosis, y la ausencia de células germinales de ovario es un fenómeno ampliamente aceptado en la edad senil. Aunque este concepto fue descrito en 1870 por Waldeyer y que ha sido aceptada por más de 150 años (Byskov *et al.*, 2005), Johnson y colaboradores (2004 y 2005) han presentado evidencias que permiten considerar la revisión de este paradigma. Estos autores han descrito la aparición de ovogénesis y foliculogénesis después del nacimiento. La hipótesis para eso son formación de nuevos folículos a partir de las células madre (*stem cells*).

Las células madre tienen una enorme importancia en el actual escenario científico. Debido a las características especiales, como la grande capacidad de división y diferenciación en otras células especializadas, las células madre están estrechamente ligadas en los estudios sobre el genoma y las terapias celulares, los dos temas considerados importantes promesas en la investigación biomédica (Eisenberg *et al.*, 2006). La mayor parte del trabajo en este ámbito se refiere a la médula ósea, que tiene diferentes poblaciones de células madre, todos ellos muestran un alto nivel de capacidad de diferenciación. El contexto 'diferenciación' se refiere a la capacidad de una célula madre para generar células de diferentes tejidos, no importando su origen embrionario. Por ejemplo, se ha demostrado que las células madre médula ósea pueden diferenciarse en células neuronales, células musculares, hepatocitos y las células cardíacas. La demostración de la diferenciación de células madre puede ser considerado como un sugerente argumento en favor de la neo-ovogénesis, hipótesis descrita por Johnson *et al.* (2004). Estos autores demostraron la presencia de marcadores específicos de la meiosis en los ovarios de ratones adultos. De acuerdo con el concepto actual, la expresión de estos marcadores se presente sólo durante la etapa fetal. En un trabajo posterior (Johnson *et al.*, 2005), los ratones fueron sometidas a una esterilización química, y la ausencia de folículos se describió después del tratamiento. Posteriormente, los animales recibieron la transfusión de sangre y médula ósea y una semana más tarde, identificaron folículos en los ovarios.

Según Bukovsky (2005), la renovación folicular después del nacimiento es un proceso habitual a todas las mujeres. Sin embargo, esto autor afirma que las células madre se deriva de epitelio superficial del ovario, en lugar de médula ósea a lo sugerido por Johnson *et al.* (2005). Bukovsky considera que el Sistema Inmune tiene un papel central en este proceso, y sugiere una nueva denominación para Sistema de Control de Tejidos. A pesar de que estos investigadores han proporcionado muy protocolos detallados para el cultivo de células madre del ovario, con la consiguiente producción in vitro de ovocitos (Bukovsky *et al.*, 2005), no hay otros informes con esta metodología en la literatura. Los resultados publicados por Antonin Bukovsky tenido una repercusión discreta, quizá porque debido a la falta de pruebas concluyentes, o tal vez porque que sus artículos se publicaron en una nueva revista, poco conocida (*Reproductive Biology and Endocrinology*).

Sin embargo, un escenario totalmente distinto que ha sucedido con los artículos de Johnson *et al.* (2004 y 2005), lo que generó efusivo y caliente debates. Cuestiones importantes se han surgido, se oponen a la hipótesis del equipo de la Universidad de Harvard. En cuanto a aspectos clínicos, la aparición de la menopausia y la falta de actividad ovárica en las mujeres seniles son fenómenos ampliamente aceptadas. Otras críticas se refieren a la falta de señales claras de inicio y finalización de la meiosis en supuestos ovocitos derivados de la médula ósea. Por otra parte, el breve período descrito para el crecimiento de los nuevos folículos genera el interrogatorio sobre la eficacia de la esterilización química. Un serio argumento fue señalado por Eggen *et al.*

(2006). En un experimento hecho específicamente para probar la hipótesis de Johnson (2004, 2005), el grupo de Eggan, también de la Universidad de Harvard, investigó la renovación folicular de células de la sangre en ratones parabióticos. Estos animales fueron quirúrgicamente dispuestos a compartir la circulación de la sangre durante más de seis meses. Una vez que una hembra era transgénica para una proteína fluorescente, se supone que los ovocitos fluorescentes deberían ser presentes en la otra hembra, pero esto no sucedió. Después de varios ensayos utilizando el ratones parabióticas, los autores concluyeron que sus resultados fueron contradictorios a la teoría de Johnson.

A pesar de la conclusión de Eggan *et al.* (2006), tenemos que prestar atención en algunos aspectos, mientras que la comparación de los estudios de los dos grupos de Harvard. Si bien el equipo de Tilly (Johnson *et al.* 2004 y 2005) ha descrito "renovación folicular", Eggan *et al.* (2006) han declarado la "ausencia de ovulación de ovocitos". Hay una diferencia, en relación con el intervalo entre la formación y el crecimiento de los folículos - aspectos inicial e intermedio - y la presencia de un ovocito maduro en la trompa uterina - último paso. Al mismo tiempo, otros grupos han intentado diferentes enfoques e fueran descritos algunos resultados muy interesantes, lo que sugiere indirectamente la aparición de renovación folicular. Por ejemplo, Dyce *et al.* (2006) cultivaron células madre de piel de fetos de la especie porcina y identificaron la presencia de "células muy próximas de ovocitos". Cuando inducidas a diferenciarse, estas células expresaron marcadores de las células germinales. Los mismos autores también identificaron la formación de "estructuras como folículos" con producción de estrógenos y progesterona, y tienen la capacidad de respuesta a la FSH y LH. Por último, el mismo estudio se describe la partenogénesis espontánea, originando "estructuras como embriones". Además de estos interesantes resultados, la diferenciación *in vitro* de células madre en células germinales también se fue descrita en líneas celulares de embriones humanos (Clark *et al.*, 2004). Sin embargo, sólo el equipo de Guelph (Dyce *et al.*, 2006) ha descrito la producción de ovocitos, folículos (secretando esteroides) y embriones obtenidos de células madre.

Más recientemente, Liu *et al.* (2007) trabajando con ovarios humanos obtenidos quirúrgicamente por razones extra ovárica (como anomalías uterinas, por ejemplo) llevaron a cabo una extensa evaluación en la expresión de genes necesarios para la meiosis. Trabajando con RT-PCR, Western Blot e inmunohistoquímica, estos autores evaluaron la expresión de genes como SCP3, Oct3, Oct4, c-KIT, SCP3, PCNA y KI-67 llegaron a la conclusión de la inexistencia de señales relacionadas con el comienzo de la meiosis en ovarios humanos adultos, y, por tanto, se oponen a la hipótesis de renovación folicular. Tilly & Johnson (2007) rápidamente presentaron una respuesta contra el artículo de Liu *et al.* (2007), con la argumentación de que "la falta de pruebas" no es un argumento aceptable para refutar sus hipótesis. Según los investigadores de Harvard, con el fin de refutar sus nuevas hipótesis, más sólidos argumentos que sólo la ausencia de expresión de los genes debe presentarse, sobre todo que más de tres años ha pasado desde el primer artículo de neo-ovogénesis (Johnson *et al.* 2004).

La polémica no parece estar a cerca de su fin, principalmente después de lo relato del nacimiento de ratones a partir de ovocitos neoformados después de lo cultivo de células madre de los ovarios de ratones adultos transgénicos para GFP y transferencia en ovarios de hembras esterilizadas químicamente (Zou *et al.*, 2009). Es importante recordar que 150 años de un sólido conocimiento ha sido cuestionado. No obstante, el cuestionamiento en sí es parte de la Ciencia y los próximos trabajos en el ambiente científico se van aclarar esta importante cuestión. Particularmente, algunas situaciones en ganado *Bos indicus* son muy interesantes. Algunas hembras Nelore producen cantidades impresionantes de ovocitos en la aspiración folicular. Nuestro grupo de trabajo ya mostro números como más de 250 ovocitos en una única aspiración folicular (Pontes *et al.*, 2008), y la donante no había recibido ningún estímulo hormonal. Así, el hipótesis de la formación continuada de ovocitos sería muy interesante de ser considerada en esta situación. Para confirmar esto, se comparó la población de folículos preantrales de hembras Nelore (*Bos taurus indicus*) y Angus (*Bos taurus taurus*) en las fases fetal y adulta. Las cantidades de folículos fueron similares y las hembras presentaron una gran variación individual con respecto a la cantidad de folículos preantrales: 41957 a 248865 folículos preantrales en los fetos de raza Nelore y 50326 a 1090140 en los fetos de raza Angus; 9623 a 260371 folículos por ovario en novillas Nelore y 33798 a 320729 folículos en Angus; y entre 8010 y 94301 folículos preantrales en vacas Nelore y 10043 y 253453 en ovarios de vacas Angus (Silva-Santos *et al.*, 2011). Así, mecanismos de control del desarrollo del folículo después de la fase preantral deben ser responsables por la diferencia entre hembras *Bos indicus* y *Bos taurus* en número de ovocitos recuperados por aspiración folicular. Nuestro grupo de trabajo también observó la ocurrencia de folículos poliovulados en 41% de los ovarios estudiados, lo que podría indicar alguna evidencia de renovación folicular post-natal, ya que son estructuras típicas de la fase fetal durante la formación de los folículos primordiales (Silva-Santos *et al.*, 2011).

### Epigenética y foliculogénesis

La epigenética se refiere al estudio de los cambios fenotípicos hereditarios que no implican alteraciones en la secuencia del ADN. En otras palabras, significa la información transportada por el genoma que no es codificada por el ADN. En eucariota, la cromatina es el estado en que el ADN es empaquetado dentro de la célula, básicamente organizado por un grupo de proteínas llamadas histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4). El nucleosomo es la unidad fundamental de la cromatina compuesta por un

octaedro de dos unidades de cada una de las cuatro histonas principales (H2A, H2B, H3 y H4) rodeado por 147 pares de bases del ADN. Hasta hace poco, sólo era conocida la función estructural del nucleosomo, así para posibilitar la organización de ADN en los núcleos celulares (Cosgrove & Wolberger, 2005).

Recientemente, un aspecto crucial y dinámico de la nucleosomo, sobre el control de los genes, de expresión se ha descrito. De acuerdo con las modificaciones covalentes, la interacción entre las histonas y el ADN puede variar, lo que permite modificaciones significativas en la transcripción del ADN. Estas modificaciones covalentes implican la adición o supresión de los grupos de productos químicos que modifican el ADN y la cohesión con el cromatina. Acetilación, metilación y fosforilación representan algunas de estas reacciones químicas. Estas modificaciones son en su mayoría reversibles, proporcionando un mecanismo dinámico para activar o reprimir la transcripción de ADN (Mellor 2006).

Las proteínas son el producto final de la transcripción de ADN y que representan los agentes de la actividad fisiológica. Aunque la secuencia de ADN es estable en un organismo, la transcripción se modulará en función de los mecanismos epigenéticos. Por ejemplo, si un nucleosomo impulsa una menor atracción entre la cromatina y el ADN, la transcripción se verá facilitada y el resultado final será un aumento de la proteína codificada en la secuencia respectiva del ADN. Por otra parte, un estrecho contacto entre el ADN y la cromatina se causa una inhibición de la actividad de transcripción.

Podemos considerar la epigenética como un puente que conecta el genoma con el fenotipo (Goldberg, 2007). Epigenética también desempeña un papel esencial en el proceso evolutivo, ya que pueden modular la expresión génica en consecuencia a estímulos externos. Este aspecto es particularmente importante en las células germinales, una vez que hay el transmisión de la información genética de generación para generación (Kimmins y Sassone-Corsi, 2005).

A medida que el universo de epigenéticos es relativamente reciente, todos los procesos fisiológicos se encuentran en las primeras etapas de sus estudios a una mejor comprensión. Por foliculogénesis, los primeros trabajos mostraron informaciones muy pertinentes. La fosforilación de la serina 10 de la histona H3 se relacionó a la actividad de transcripción propicio para el proceso de división celular (Hans y Dimitrov, 2001). A su vez, este cambio de H3 se presentó vinculada a la acción de la FSH y estradiol, durante la etapa pre-ovulatoria, mostrando la estrecha relación de este cambio en la regulación de la cromatina con el crecimiento folicular (Ruiz-Cortés *et al.* 2005). La lisina 4 (K4) de histona H3, ha atraído el interés de los investigadores. El H3K4 y enzima reguladora de su metilación - LSD1 - parecen tener un papel central en el control de la expresión génica de los gametos, empezando en organismos más simples, como *Drosophila* (Di Stefano *et al.*, 2007), como también en los mamíferos (Godmann *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo folicular, se demostró una particular distribución de H3K4 mono, di y tri-metilada, con presencia bien definidos en los folículos antrales y una sorprendente disminución progresiva con la proximidad de la ovulación (Seneda *et al.*, 2008). La presencia de H3K4 marcados durante el desarrollo folicular parece ser especialmente interesante en el papel de la epigenética sobre el control de plenipotencia de células progenitoras (Surani *et al.*, 2007). El desempeño de H3K4 se ha detectado en la restauración de plenipotencia en las células somáticas (Kimura *et al.*, 2004; Lin & Dent, 2006), mostrando la importancia de H3K4 no sólo para comprender la foliculogénesis, sino también a ofrecer perspectivas de investigaciones entre aspectos epigenéticos y la posibilidad de renovación folicular post-natal. Curiosamente, la epigenética desempeña un papel especial en la plenipotencia de las células madre (Surani *et al.*, 2007). H3K4 es particularmente importante en el restablecimiento de plenipotencia de las células somáticas (Kimura *et al.*, 2004; Lin y Dent, 2006). Este escenario abre un amplio campo de oportunidades para la investigación científica. También sugiere que podría ser epigenética uno punto de partida para entender la regulación de la foliculogénesis y para probar la nueva hipótesis de renovación folicular.

De igual importancia en el comprensión de la epigenética y foliculogénesis son los complejos de proteínas capaces de promover una forma de "deslizamiento" del nucleosomo, modificando las transcripciones de genes (Cosgrove *et al.*, 2004). Estos complejos se llaman re-modeladores de la cromatina o re-modeladores de nucleosomo. El eucariotas tener al menos cinco familias de re-modeladores de la cromatina: SWI / SNF, ISWI, NURD/Mi-2 y SWR1 (Saha *et al.*, 2006). Con gran potencial para desempeñar papel central en la actividad reproductiva de las hembras, tenemos la proteína BRG1 (*Brahma related gene 1*). Se trata de una subunidad de la ATP-ase familia SWI / SNF con gran impacto sobre fenotipo celular (Reisman *et al.*, 2005) y con papel crucial en la activación del genoma embrionario (Bultman *et al.*, 2006). Recientemente se demostró la presencia de BRG1 en las células foliculares y ovocitos, junto con patrones específicos de crecimiento de las células de la granulosa y teca, así como los cambios en las etapas de maduración del ovocitos (Seneda *et al.*, 2008). La importancia de BRG1 sí ampliamente en el desarrollo embrionario. Camundongos mutantes (no tenían el gene BRG1) tenían la capacidad normal para producir ovocitos, e estos fueran fertilizados. Pero los embriones se quedaron en estadio de dos células, una vez que había uno completo bloqueo y había 30% de reducción en la transcripción de los genes, en particular el control del ciclo celular, lo que demuestra claramente el papel crucial de la epigenética sobre el control de oogénesis y embriogénesis (Bultman *et al.*, 2006).

## Observaciones finales

Como se describe brevemente, la regulación de foliulogénesis sigue siendo como un universo por explorar. A pesar de los extraordinarios progresos que hemos visto en los últimos años, hay varios problemas que hay que solucionar, sobre todo en la fase preantral. ¿Cómo se inicia la activación? ¿Cómo se controla la activación y represión de tantos genes? ¿Por qué sólo unos pocos folículos se envían a los factores de crecimiento por tiempo? ¿Existe sólo un mecanismo regulador central para todo?

Neo-ovogénesis todavía puede ser considerado como un objeto de hipótesis. Sin embargo, parece razonable prever algunas modificaciones en el concepto actual de la reserva folicular ovárica. Tal vez esta hipótesis se demostró en parte o quizá de una manera diferente, pero es razonable creer que algo nuevo va a suceder. Si una analogía se puede hacer con el proceso de renovación de células neuronales, que se consideraba imposible hace algunos años, hoy en día se trata de un mecanismo bien documentado.

Es bastante evidente que la epigenética se está convirtiendo en un amplio campo de posibilidades para estudiar mecanismos de regulación de genes y funciones en el ovario y profundamente investiga la hipótesis de renovación folicular. A pesar del desafío, ya que la interacción entre la cromatina y el ADN es un proceso muy dinámico, los estudios recientes indicaron que el nucleosomo puede orquestar un papel fundamental en la estructura esencial del comienzo de la vida: el folículo ovárico.

## Referencia Bibliográfica

- Bukovsky, A. 2005. Can ovarian infertility be treated with bone marrow – or ovary derived- stem cells? *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 36 <http://www.rbej.com/content/3/1/36>
- Bukovsky, A., Svetlikova, M., Caudle, M.R. 2005. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 17 <http://www.rbej.com/content/3/1/17>
- Bultman, S., Gebuhr, T.C., Pan, H., Svoboda, T., Schultz, R.M., Magnuson, T. 2006. Maternal BRG1 regulates zygote genome activation in the mouse. *Genes & Dev.* 20:1744-54.
- Buratini, J. Jr., Teixeira, A.B., Costa, I.B., Glapinski, V.F., Pinto, M.G.L., Giometti, I.C., Barros, C.M., Cao, M., Nicola, E.S., Price, C.A. 2005. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction* 130:343-50.
- Byskov, A.G., Faddy, M.J., Lemmen, J.G., Andersen, C.Y. 2005. Eggs forever? *Differentiation* 73:438-46.
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., Wolberger, C. 2004. Regulated nucleosome mobility and histone code. *Nature* 11:1037-43.
- Cosgrove, M.S., Wolberger, C. 2005. How does the histone code work? *Biochemistry and Cell Biology* 83:468-76.
- Clark, A.T., Bodnar, M.S., Fox, M., Rodriguez, R.T., Abeyta, M.J., Firpo, M.T., Pera, R.A. 2004. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Human Molecular Genetics* 13:727-39.
- Di Stefano, L., Ji, J.Y., Monn, N.S., Herr, A., Dyson, N. 2007. Mutation of drosophila LSD1 disrupts H3-K4 methylation, resulting in tissue-specific defects during development. *Current Biology* 17:808-12.
- Dyce, P.W., Lihua, W., Li, J. 2006. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology* 8:384-90.
- Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I.M., Wagers, A.J. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 441:1109-14.
- Eisenberg, C.A., Burch, J.B., Eisenberg, L.M. 2006. Bone marrow cells transdifferentiate to cardiomyocytes when introduced into the embryonic heart. *Stem cells* 24:1236-1245.
- Godmann, M., Auger, V., Ferraroni-Aguiar, V., Di Sauro, A., Sette, C., Behr, R., Kimmins, S. 2007. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, (in press).
- Goldeberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E. 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128:635-38.
- Gutierrez, C.G., Ralph, J.H., Telfer, E.E., Wilmut, I., Webb, R. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology of Reproduction* 62:1322-28.
- Hans, F., Dimitrov, S. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Nature* 20(24):3021-27.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., Tilly, J.L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428:145-50.
- Johnson, J. et al. 2005. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell* 122:303-15.

- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Heath, D.A., Smith, P., Reader, K.L., Lawrence, S.B., O'Connell, A.R., Laitinen, M.P., Cranfield, M., Groome, N.P., Ritvos, O., McNatty, K.P. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction* 68:1777-89.
- Kimmins, S., Sassone-Corsi, P. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434:583-89.
- Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N., Tada, T. 2004. Histone Code Modifications on Pluripotential Nuclei of Reprogrammed Somatic Cells. *Molecular and Cellular Biology* 24: 5710-20.
- Lin, W., Dent, S. Y. R. 2006. Functions of histone-modifying enzymes in development. *Current Opinion in Genetics & Development* 16: 137-42.
- Liu, Y., Wu, C., Lyu, Q., Yang, D., Albertini, D.F., Keefe, D.L., Liu, L. 2007. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Developmental Biology* (in press).
- Mannikko, M., Tormala, R.M., Tuuri, T., Haltia, A., Martikainen, H., Ala-Kokko, L., Tapanainen, J.S., Lakkakorpi, J.T. 2005. Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. *Human Reproduction* 20(6): 1578-85.
- Mellor J. 2006. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends in Genetics* 22(6): 320-29.
- Nilsson, E., Parrot, J.A., Skinner, M.K. 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175: 123-30.
- Nilsson E., Kezele, P., Skinner, M.K. 2002. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology* 188: 65-73.
- Nogueira, M.F.G., Buratini, Jr. J., Price, C.A., Castilho, A.C.S., Pinto, M.G.L., Barros, C.M. 2007. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 74: 680-86.
- Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* (in press).
- Reisman, D.N., Sciarrotta, J., Boudin, T.W., Weissman, B.E., Funkhouser, W.K. 2005. The expression of the SWI/SNF ATPase subunits BRG1 and BRM in normal human tissues. *Appl. Immunohistochem Mol. Morphol.* 13: 66-74.
- Ruiz-Cortés TZ, Kimmins S, Monaco L, Burns KH, Sassone-Corsi P, Murphy BD. 2005. Estrogen mediates phosphorylation of histone H3 in ovarian follicle and mammary epithelial tumor cells via the mitotic kinase, aurora B. *Molecular Endocrinology* 19(12): 2991-3000.
- Saha, A., Wittmeyer, J., Cairns, B.R. 2006. Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature* 7:437-447.
- Seneda, M.M., Godmann, M., Murphy, B.D., Kimmins, S., Bordignon, V. 2008. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. *Reproduction* 135: 829-838.
- Silva, J.R.V., van den Hurk, R., van Tol, H.T.A., Roelen, B.A.J., Figueiredo, J.R. 2004. Gene expression and protein localisation for activin – a, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *Journal of Endocrinology* 183: 405-15.
- Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Siloto, L.S., Hertel, M.F., Andrade, E.R., Rubin, M.I.B., Sturion, L., Melo-Sterza, F.A., Seneda, M.M. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, in press.
- Soto-Suazo M, Zorn TM. 2005. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Animal Reproduction* 3:147-60.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. 2007. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128:747-62.
- Tilly, J.L. and Johnson, J. 2007. Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary: is an absence of marker gene expression really acceptable evidence of an absence of oogenesis? *Cell Cycle* 6(8):879-83.
- van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63:1717-51.
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. 2000. In vivo treatment with GDF9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141:3814-20.
- Zhao, J., Taverne, M.A.M., van der Weijden, G.C., Bevers, M.M., van den Hurk, R. 2001. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biology of Reproduction* 65:967-77.
- Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R., Wu, J. 2009. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology* 11:631