

DE BOVIENE OVARIËLE FOLLICULAIRE DYNAMIEK DEEL I: FOLLICULOGENESE EN PRE-ANTRALE ONTWIKKELING

J.M.J. Aerts, P.E.J. Bols

Laboratorium voor de Fysiologie van de Huisdieren, Universiteit Antwerpen,
Departement Diergeneeskunde, Universiteitsplein 1, Gebouw U, B-2610 Wilrijk
jan.aerts@ua.ac.be

SAMENVATTING

Het recent wetenschappelijk onderzoek naar de pre-antrale folliculaire dynamiek heeft geleid tot de ontdekking van een plethora van hormonen en lokale mediators die elk een rol vervullen bij de activering van de primordiale follikel en de ontwikkeling tot de antrale follikel. Ondermeer door de bijdragen van de genetica en de moleculaire biologie is voor een aantal van deze factoren de werking in min of meerdere mate opgehelderd. Cruciale vragen, zoals het mechanisme van de activering van de primordiale follikels en de rol van oöcyten en granulosa cellen in deze activering, blijven evenwel onopgelost.

In dit overzichtsartikel wordt eerst het embryonale ontstaan van het ovarium en de follikels toegelicht. Daarna worden de verschillende fasen in de ontwikkeling van primordiale tot pre-antrale follikel besproken. Vervolgens wordt een kort overzicht gegeven van de diverse *in vitro* modellen die de studie van de folliculaire dynamiek mede mogelijk maken. Tenslotte wordt dieper ingegaan op de eigenlijke pre-antrale folliculaire ontwikkeling, meer specifiek op de huidige hypothesen aangaande de activering van de primordiale follikels en de rol van de gonadotropinen en de angiogenese.

INLEIDING

Het recent wetenschappelijk onderzoek naar de folliculaire dynamiek richt zich in toenemende mate tot de vroege ontwikkeling van de follikel, met name de fasen van de primordiale tot pre-antrale follikel.

Bij zoogdieren bevatten de ovaria een grote reserve aan niet-groeiende primordiale follikels. Een primordiale follikel bestaat uit een immature, rustende eicel of oöcyt omgeven door één laag afgeplatte (pre-) granulosa cellen. Bij een aantal diersoorten (onder andere knaagdieren) gebeurt de vorming van de primordiale reserve rond het tijdstip van de geboorte. Bij de primaten en gedomesticeerde diersoorten ontstaat de reserve van primordiale follikels reeds tijdens het fetale leven. De overgang van niet-groeiende naar groeiende follikels is een geleidelijk proces dat kort na het ontstaan van de follikels begint en doorgaat tot op het einde van het reproductieve leven (Fortune *et al.*, 1997).

Onder "initiëring" of "activering" van de folliculaire groei wordt de overgang van de primordiale follikel naar de primaire follikel verstaan. Dit gaat gepaard met een proliferatie en differentiatie van de granulosa cellen: in de primaire follikel zijn de granulosa cellen cuboïdaal in plaats van afgeplat, en het aantal

granulosa cellen neemt toe. Tijdens de volgende groeifasen ondergaat de eicel een volumevergroting en verschijnt tussen de eicel en de granulosa cellen een zona pellucida (van Wezel en Rodgers, 1996). Het merendeel van de geactiveerde follikels evolueert tot de antrale fase, tijdens dewelke een holte of 'antrum' wordt gevormd, waarna ze regresseren en een geprogrammeerde celdood (apoptose) ondergaan, tenzij ze onder invloed van follikel stimulerend hormoon (FSH) opgenomen worden in een groeigolf.

Weinig is bekend over de factoren die verantwoordelijk zijn voor de initiëring van follikelgroei (Nilsson *et al.*, 2001). Kennis van de reguleringsmechanismen van de vroege folliculaire populaties zou een belangrijke bijdrage kunnen leveren tot een verhoging van de reproductieve efficiëntie van onze huisdieren, en tot het behoud van met uitsterven bedreigde diersoorten. Ook (jonge) vrouwen bij wie de fertiliteit ten gevolge van een chemo- of bestralingstherapie aangetast is, zouden baat kunnen hebben bij *in vitro* cultuur van op voorhand gepreleveerde primordiale follikels (Cecconi, 2002).

EMBRYONALE ONTWIKKELING VAN OVARIIUM EN FOLLIKELS

Het ontstaan van de gonade begint aan de ventromediale rand van de oornier of mesonephros. Door de proliferatie van het coeloomepitheel en een gelijktijdige verdichting van het onderliggende mesenchym ontstaan de genitale kammen. Bij het runderembryo verschijnen de genitale kammen vanaf de 28^{ste} tot de 32^{ste} dag van de dracht (Noden en de Lahunta, 1985; Rüsse en Sinowatz, 1991). Aanvankelijk bevinden er zich geen kiemcellen in deze genitale kammen. De primordiale kiemcellen liggen dan nog in de wand van de dooierzak, dichtbij de basis van de allantois. Door amoëboïde bewegingen en met behulp van pseudopodia migreren de primordiale kiemcellen langs de wand van de einddarm en het dorsale mesenterium naar de genitale kammen. Bij het rund gebeurt dit tussen de 30^{ste} en de 34^{ste} dag van de dracht (Rüsse en Sinowatz, 1991). Er zijn aanwijzingen dat de migratie van de primordiale kiemcellen naar de genitale kammen gecontroleerd wordt door chemotactische signalen, zoals Kit Ligand (Buehr *et al.*, 1993) en integrinen (Anderson *et al.*, 1999).

Door epitheelproliferaties die in het mesenchym van de genitale kammen dringen, ontstaan de primaire of medullaire geslachtsstrengen. Deze termen worden veelal als synoniemen gebruikt, maar volgens Smitz en Cortvrindt (2002) kunnen de epitheliale strengen verder van mekaar onderscheiden worden op basis van hun herkomst, waarbij de medullaire strengen afkomstig zijn van het mesonephros en de primaire strengen van het coeloomepitheel. De medullaire geslachtsstrengen worden opgebroken in celgroepjes en vormen het rete ovarii (Lin *et al.*, 2002) en het vasculair stroma van het ovarium (Lin *et al.*, 2002; Smitz en Cortvrindt, 2002). Bij het mannelijk embryo ontstaan uit een gelijkaardig rete testis de tubuli seminiferi.

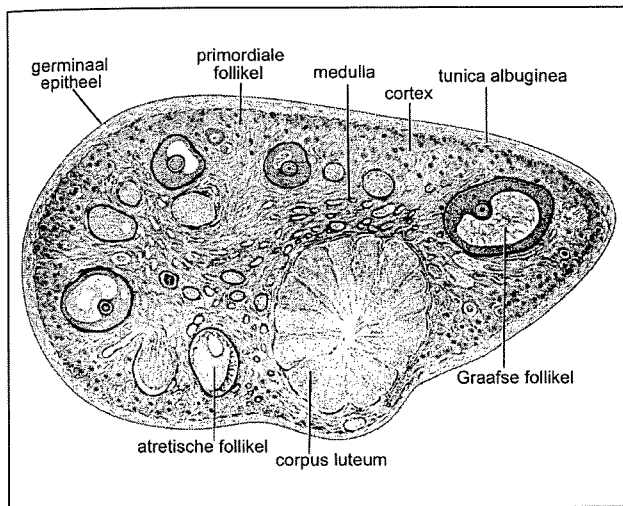
Bij aankomst in de gonade worden de primordiale kiemcellen geïncorporeerd in de primaire geslachtsstrengen (Smitz en Cortvrindt, 2002). De primaire strengen degenereren evenwel en worden vervangen door nieuwe epitheelproliferaties. Tijdens de groei van deze secundaire of corticale geslachtsstrengen worden de aanwezige primordiale kiemcellen ingebed in de ontwikkelende structuren (Lin *et al.*, 2002). Medullaire strengen leveren zodoende een belangrijke bijdrage tot de medulla van de toekomstige gonade, corticale strengen aan de cortex.

De primordiale kiemcellen die vanuit de dooierzak naar de gonaden migreren, ondergaan voortdurend

mitotische delingen waardoor hun aantal toeneemt. Bij de muis bedraagt de populatie primordiale kiemcellen die de gonaden bereiken, meerdere duizende (Tam en Snow, 1981). Ook in de gonade blijft het grootste gedeelte van de primordiale kiemcellen prolifereren, maar reeds vóór de geboorte neemt het aantal oöcyten drastisch af ingevolge apoptosis. Het maximum aantal kiemcellen wordt bereikt rond het tijdstip van de transitie van mitose naar meiose (Gondos, 1978). Bij de mens situeert dit maximum zich in de vijfde maand van de fetale ontwikkeling met ca. 7 000 000 kiemcellen, waarvan er bij de geboorte slechts ca. 2 000 000 overblijven (Pepling en Spradling, 2001). Bij het rund ligt het maximum rond 2 100 000 kiemcellen, die gereduceerd worden tot gemiddeld 130.000 bij de geboorte (Erickson 1966a, Erickson 1966b). Kiemcelapoptosis lijkt een universeel voorkomend proces te zijn, aangezien alle tot op heden bestudeerde gewervelde dieren geboren worden met aanzienlijk minder oöcyten dan het maximum aantal tijdens de vroege ontwikkeling (Vaskivuo, 2002).

Wanneer de primordiale kiemcellen zich in de primaire geslachtsstrengen van de gonade genesteld hebben, worden ze bestempeld als oögonia (Kaipia en Hsueh, 1997). Kiemeilandjes bestaan uit een aantal oögonia omgeven door somatische cellen, die als voorlopers van de granulocellen worden beschouwd. De mitosen van de oögonia binnen eenzelfde celgroepje verlopen synchroon maar met onvolledige deling van het cytoplasma (Pepling en Spradling, 1998). Daardoor blijven de oögonia met mekaar verbonden door cytoplasmatische bruggen, en vormen ze een syncytium. Na meerdere mitosen verdubbelen de oögonia hun DNA en ondergaan ze de eerste meiotische deling, die vervolgens wordt stilgelegd in de diploteenfase, waardoor primaire oöcyten ontstaan.

Nadat de meiose is ingezet, sturen epitheliale cellen van de geslachtsstrengen geleidelijk cytoplasmatische uitlopers tussen de verbonden oöcyten, waardoor de celcluster gescheiden wordt in individuele oöcyten omgeven door een éénlagig afgeplat epitheel van (pre)granulocellen. Tegelijkertijd wordt een basale membraan aangelegd die de aldus gevormde primordiale follikel afscheidt van het ovariële stroma. Ten slotte worden de nieuw gevormde primordiale follikels van mekaar gescheiden door cytoplasmatische uitlopers van de stromacellen tussen de basale membranen (Merchant-Larios en Chimal-Monroy, 1989).



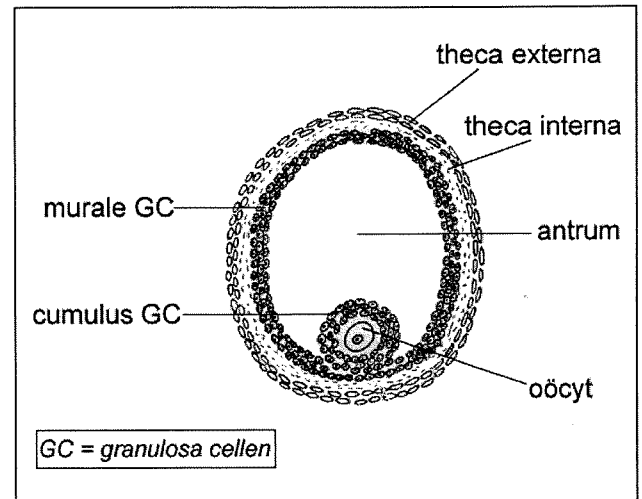
Figuur 1. Schematische opbouw van het ovarium (naar Junqueira *et al.*, 1993).

Wanneer de ontogenese van het ovarium voltooid is, kan een onderscheid gemaakt worden tussen een perifere cortex, waarin zich de follikels bevinden, ingebed tussen fibroblasten, collageen- en elastinevezels en een centrale medulla, die de bloedvaten, lymfevaten en zenuwvezels bevat. Het geheel is omhuld door een éénlagig cuboïdaal germinaal epitheel. Onder het epitheel bevindt zich de tunica albuginea, die opgebouwd is uit een laag dichts collageen bindweefsel (Figuur 1).

CLASSIFICATIE VAN PRE-ANTRALE FOLLIKELS

Teneinde de studie van de pre-antrale folliculaire populaties op een systematische manier te benaderen, worden deze geclassificeerd in duidelijk omschreven stadia. Courant worden de begrippen primordiale, primaire, secundaire en tertiaire follikel gehanteerd. In een primaire follikel is de oöcyt omgeven door één laag cuboïdale granulosa cellen. Een secundaire follikel wordt gekarakteriseerd door twee of meer lagen granulosa cellen en door een beginnende depositie van de zona pellucida (Fair, 2003). De tertiaire follikel tenslotte kan verder opgedeeld worden in een vesiculaire follikel, die een holte of antrum vertoont, en een rijpe of Graafse follikel.

Naargelang de diersoort bestaan meer specifieke classificatiesystemen. Zo bijvoorbeeld de histologische classificatie van boviene pre-antrale follikels volgens Braw-Tal en Yossefi (1997) (Tabel 1). Primordiale follikels (type 1) worden daarin gekarakteriseerd door een rustende oöcyt, waarvan de meiose is stilgelegd in profase I, omgeven door een beperkt aantal (<10) afgeplatte granulosa cellen. Deze pri-



Figuur 2. Morfologie van een Graafse follikel.

mordiale follikels vormen de ovariële reserve waaruit follikels worden gerecruiteerd voor ontwikkeling. Na initiëring van de groei ontstaat een eerste ontwikkelingsfase waarbij de granulosa cellen een transformatie ondergaan van afgeplat naar cuboïdaal en toenemen in aantal. Een primaire follikel (type 2) wordt gekenmerkt door een volledige laag cuboïdale granulosa cellen, omgeven door een basale membraan. In een tweede groeifase neemt het aantal granulosa cellen verder toe. Wanneer de follikel minstens 40 granulosa cellen bevat, begint ook de oöcyt te groeien, wat zich vertaalt in een snelle toename van de diameter. De groei van de eicel induceert tevens het verschijnen van de zona pellucida. Deze wordt voor het eerst gesecreteerd in kleine pre-antrale follikels (type 3), maar volledige omsluiting van de oöcyt wordt pas bereikt in de grote pre-antrale fase (type 4) (Braw-Tal en Yossefi, 1997). Thecacellen zijn afkomstig uit het interstiële stroma en kunnen herkend worden als individuele cellen op de basale membraan van de primaire follikel (Hirshfield, 1991). Theca-internacellen kunnen reeds geïdentificeerd worden in kleine pre-antrale follikels (type 3), maar een duidelijk afgebakende theca-internalaag ontstaat pas in grote pre-antrale follikels (type 4) (Figuur 2). De thecaexternalaag is sterk gevasculariseerd en voorziet zo de follikel van endocriene factoren. Het begin van antrumvorming kan worden vastgesteld bij follikels met meer dan 250 granulosa cellen. Aanvankelijk ontstaan meerdere met vloeistof gevulde holten tussen de granulosa cellen. Wanneer deze samen vloeien tot één geheel, wordt de follikel bestempeld als 'antraal' (Smitz en Cortvrindt, 2002).

Tabel 1. Classificatie van pre-antrale boviene follikels (naar Braw-Tal en Yossefi, 1997).

Follikel	n	Aantal lagen GC	Aantal GC (*)	Follikel diameter (range, μm)	Oöcyt diameter (gem. \pm SEM; μm)	Zona pellucida aanwezigheid	Theca interna aanwezigheid
Primordiaal (type 1)	105	1	<10 (afgeplat)	<40	29,7 \pm 0,3	-	-
Primair (type 2)	93	1-1,5	10-40 (cuboidaal)	40-80	31,1 \pm 0,4	-	-
Klein pre-antraal (type 3)	17	2-3	41-100	81-130	49,5 \pm 2,4	-	+/-
Groot pre-antraal (type 4)	13	4-6	101-250	131-250	68,6 \pm 2,8	+	+
Klein antraal (type 5)	10	>6	>250	250-500	92,9 \pm 4,5	++	++

GC = granulosa cellen

n = aantal onderzochte niet-atretische follikels

(*) op grootste doorsnede

IN VITRO MODELLEN VOOR DE STUDIE VAN DE PRE-ANTRALE FOLLICULAIRE ONTWIKKELING

Recente inzichten in de folliculaire dynamiek tijdens de oestrische periode zijn veelal het gevolg van nieuwe onderzoeksmethoden die de voorbije decennia ontwikkeld werden. Met name de transrectale en/of transvaginale echografie wordt sedert het einde van de tachtiger jaren veelvuldig gebruikt in de diergeneeskunde en heeft dynamische follow-up studies van de antrale folliculaire populatie mogelijk gemaakt. Voor het eerst werd het mogelijk om de groei van follikels met een diameter vanaf 2 à 3 mm dagelijks op te volgen. De veel kleinere pre-antrale follikels kunnen echografisch echter niet in beeld worden gebracht. Om deze follikels te bestuderen moest uitgekeken worden naar andere onderzoeksmethoden, zoals moleculair biologische technieken, ontwikkeling van en studies met knock-out muizen, *in vitro* kweekmethoden of een combinatie daarvan.

Knock-out muizen zijn transgene proefdieren waarbij in het genoom de werking van een specifiek gen ontregeld werd. Dergelijke muismodellen worden onder andere ontwikkeld om de functie van intra- en extraovariële factoren in de folliculogenese te

bestuderen en de embryogenese van het voortplantingsstelsel te ontrafelen (Matzuk, 2000). Transgene muizen vormen een fundamentele stap in het begrijpen van de diverse geninteracties die *in vivo* resulteren in een normaal functionerend ovarium.

De *in vitro* cultuur van geïsoleerde primordiale follikels werd vooralsnog enkel gerealiseerd bij muizen. Pogingen om primordiale en primaire follikels van het rund en de mens te kweken, hebben geleid tot massale follikeldegeneratie na enkele dagen cultuur (Smitz en Cortvrindt, 2002). Daarom werden diverse orgaanculturen ontwikkeld om de studie van pre-antrale follikels bij andere diersoorten mogelijk te maken. De ovaria van knaagdieren zijn voldoende klein om ze in hun geheel in een orgaanbad te laten overleven. De grotere ovaria van onze huisdieren laten een dergelijke cultuur evenwel niet toe. Bijgevolg werden systemen op punt gesteld om stukjes ovariële cortex, die de primordiale follikels bevatten, in cultuur te brengen. Een derde mogelijkheid is de zogenaamde *in ovo* cultuur die recent werd ontwikkeld. Stukjes ovariële cortex van onder andere runderen worden onder de allantochorion membraan van kippeneieren geënt, waar ze na enige tijd gevasculariseerd worden (Cushman *et al.*, 2002).

In meerdere *in vitro* orgaancultuurexperimenten kon worden vastgesteld dat bij in cultuur gebrachte stukjes ovariële cortex het merendeel der primordiale follikels geactiveerd wordt, wat sterk contrasteert met de geleidelijke activering van follikels vanuit de ovariële reserve *in vivo* (Fortune, 2003). Dit zou er kunnen op wijzen dat *in vivo* voornamelijk inhiberende invloeden inwerken op het ovarium, die de activering van follikels tegengaan. Een andere verklaring kan worden gezocht in het cultuurmedium, dat rijker is aan nutriënten en zuurstof dan de avasculaire ovariële cortex waar de rustende oöcyten zich normaliter bevinden. De groeiende oöcyten bevinden zich echter steeds op de sterk gevasculariseerde corticomediale overgang. Dit suggereert dat de activering en de groei van primordiale follikels afhankelijk zouden zijn van de aanvoer van hormonen, nutriënten en factoren door het bloed (McNatty *et al.*, 2000).

Bij de *in ovo* experimenten daarentegen, ontbrak follikelactivering vrijwel volledig. Deze follikels behielden nochtans het vermogen om geactiveerd te worden, wat werd aangetoond door stukjes cortex die eerst twee dagen *in ovo* werden gecultiveerd, in een *in vitro* orgaansysteem onder te brengen, hetgeen resulteerde in een afname van het aantal primordiale follikels en een toename van het aantal primaire follikels (Cushman *et al.*, 2002). Uit de *in ovo* opstelling zou men kunnen afleiden dat de groei-inhibitie van primordiale follikels onder fysiologische omstandigheden niet uitsluitend een gevolg is van ovariële inhibitoren. De *in ovo* techniek zou zodoende een goed model kunnen vormen voor de studie van de initiëring van folliculaire groei (Smitz en Cortvrindt, 2002).

In vivo neemt de transitie van primordiale naar primaire follikel bij de mens zo'n 120 dagen in beslag (Gougeon, 1996). Bij *in vitro* cultuur gebeurt deze overgang in slechts enkele dagen. Dit geeft aan dat de cultuurmedia die op het ogenblik worden gebruikt, er onvoldoende in slagen een natuurlijke omgeving voor follikelgroei, zoals deze onder fysiologische omstandigheden voorkomt, na te bootsen. Het illustreert ook hoe weinig nog maar bekend is over de reguleringsmechanismen van folliculaire ontwikkeling, waardoor de eicelgroei gecoördineerd wordt met de proliferatie en differentiatie van granulosa-cellen. (Smitz en Cortvrindt, 2002).

PRE-ANTRALE FOLLICULAIRE ONTWIKKELING

Bij de geboorte bevatten de ovaria van onze huisdieren en van de primaten een eindige reserve aan primordiale follikels, dit in tegenstelling tot de rodentia waarbij deze reserve wordt gevormd tijdens de eerste dagen na de geboorte (Fortune, 2003). Bij het rund worden de fetale primordiale follikels gevormd rond de 140^{ste} dag van de dracht (Rüsse, 1983). De follikelrecruterings start onmiddellijk na de vorming van de primordiale follikels en verloopt continu tot bij de depletie van het ovarium. Reeds tijdens het foetale leven verschijnen de eerste antrale follikels, bij het rund rond de 230^{ste} dag van de dracht (Rüsse, 1983).

De ontwikkeling van primordiale tot pre-ovulatoire follikel is een langdurig proces dat bij het rund gemiddeld 180 dagen in beslag neemt (Lussier *et al.*, 1987). Aangezien aangetoond werd dat de ontwikkeling van antrale follikels gemiddeld 42 dagen bedraagt (Lussier *et al.*, 1987), met andere woorden twee oestrische perioden omvat, wordt het grootste gedeelte van de totale folliculaire ontwikkelingstijd besteed aan de pre-antrale fasen.

De continue activering van primordiale follikels staat in scherp contrast met de cyclische recruterings van antrale follikels tijdens de oestrische periode. Als gevolg van deze constante activering van primordiale follikels zijn er bij elke oestrische FSH-opstoot voldoende antrale follikels beschikbaar om opgenomen te worden in de cohorte groeiende follikels.

Activering van primordiale follikels

Het mechanisme van de activering van primordiale follikels is nog grotendeels onopgelost. Het is bekend dat FSH één van de voornaamste regulatoren is van de folliculogenese *in vivo*. *In vitro* kon evenwel geen proliferatief effect van FSH worden vastgesteld (Nilsson en Skinner, 2001). Aangezien FSH-receptoren in primordiale follikels uitsluitend voorkomen op granulosa-cellen, is van daaruit de redenering ontstaan dat granulosa-cellen op hun beurt de groei van de oöcyt reguleren (Senbon *et al.*, 2003), onder meer door stimulering van de productie van lokale groeifactoren (Nilsson en Skinner, 2001). Meer en meer wordt echter duidelijk dat de oöcyt actief participeert in het proces van folliculaire ontwikkeling en mogelijk zelfs de folliculogenese stuurt.

Een eerste indicatie voor de centrale rol van de oöcyt kan worden gevonden in de formatie van follikels. Deze lijkt gecoördineerd te worden door de transcriptiefactor Factor In the Germline α (FIG α),

die door oöcyten tot expressie wordt gebracht. Studies van FIG α -knock-out muizen hebben aangetoond dat het functioneren van deze factor van cruciaal belang is voor de vorming van primordiale follikels (Soyal *et al.*, 2000). FIG α -knock-out muizen bezitten geen functionele primordiale follikels en zijn dan ook steriel.

Verdere aanwijzingen voor een dirigerende rol van de oöcyten vinden we in het werk van Eppig *et al.* (2002), die bij de muis oöcyten uit secundaire follikels transfereerden naar primordiale follikels, waaruit vooraf de eicel verwijderd werd. Daardoor nam de primordiale follikel karakteristieken aan van de secundaire follikel, met differentiatie van de granulocellen alsook een verdubbeling van de groeisnelheid. De oöcyten konden na maturatie bevrucht worden en gaven aanleiding tot normaal ontwikkelende embryo's.

De vroege folliculaire ontwikkeling is bovendien afhankelijk van een aantal factoren van de Transforming Growth Factor β -familie (TGF β), die door de oöcyt gesecreteerd worden: Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) en Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) (Elvin *et al.*, 2000; Knight en Glistler, 2003). Ook de door de oöcyt geproduceerde Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) induceert de groei van primordiale follikels (Nilsson *et al.*, 2001).

De oöcyten spelen tevens een sleutelrol in het ontstaan van een heterogeen patroon van genexpressie door granulocellen (Eppig, 2001). Zo brengen cumulus granulocellen bijvoorbeeld minder LH-receptoren tot expressie dan murale granulocellen (Figuur 2); de LH-receptorexpressie op murale granulocellen kent bovendien een duidelijke toename naarmate de follikel matureert, terwijl het aantal LH-receptoren op cumulus granulocellen weinig verandert (Goudet *et al.*, 1999).

Anderzijds vereist de activering van primordiale follikels de aanwezigheid van Kit Ligand, ook gekend als Stem Cell Factor, die gesecreteerd wordt door granulocellen. De receptor voor Kit Ligand, C-Kit, wordt onder andere tot expressie gebracht op groeiende oöcyten, stromacellen en gedifferentieerde thecacellen (Parrot en Skinner, 1999; Nilsson en Skinner, 2001). Kit Ligand heeft een chemotactische functie bij de migratie van primordiale kiemcellen naar de ontwikkelende gonade (zie hoger). Kit Ligand heeft tevens een anti-apoptotisch effect op primordiale kiemcellen, oögonia, oöcyten en pre-antrale follikels en het controleert de groei van oöcyten en de differentiatie van thecacellen (Driancourt *et al.*, 2000).

Muizen met mutaties van de genen die coderen voor Kit Ligand of C-Kit, vertonen allerlei fertiliteitsproblemen - gaande van de afwezigheid van kiemcellen tot het onvermogen tot initiëring van folliculaire groei - die een weerspiegeling zijn van de cruciale rol van de Kit Ligand/C-Kit interactie in de folliculogenese. Door de C-Kitreceptor gedurende de eerste levensdagen op verschillende tijdstippen te blokkeren met antistoffen, kon bij de muis onder experimentele omstandigheden worden aangetoond dat er een stapsgewijze behoefte bestaat aan Kit Ligand tijdens de folliculogenese (Yoshida *et al.*, 1997).

De communicatie tussen oöcyt en granulocellen wordt mogelijk gemaakt door het voorkomen van 'gap junctions' tussen beide en tussen granulocellen onderling. Daardoor functioneert de follikel als een syncytium die bidirectionele communicatie mogelijk maakt. Enerzijds stuurt de oöcyt de proliferatie, differentiatie en functie van de granulocellen, anderzijds hebben de granulocellen een voedende en regulerende taak ten opzichte van de oöcyt. Zoals hoger reeds aangehaald wordt de follikel omgeven door een basale membraan, waarbij aan de folliculaire kant van deze membraan geen bloedvaten lopen. De follikel zelf is daardoor avasculair en de eicel dient alle metaboliëten en informatiemoleculen te betrekken via de granulocellen. Ook na de vorming van de zona pellucida wordt het contact tussen eicel en granulocellen door middel van 'gap junctions' (Senbon *et al.*, 2003) en 'cumulus cell process endings' (de Loos *et al.*, 1991) onderhouden. De granulocellen die via cytoplasmatische uitstulpingen doorheen de zona pellucida contact maken met de oöcyt, zullen later de corona radiata vormen (Rüsse, 1983).

Volgens Braw-Tal (2002) kan de activering van de folliculaire groei opgedeeld worden in twee fasen. In een eerste fase ondergaan de granulocellen een transformatie van afgeplat naar cuboïdaal. Het verschijnen van cuboïdale granulocellen zou geen toevalsproces zijn, maar zou beïnvloed worden door het aantal aanwezige granulocellen. Vanaf het ogenblik dat boviene follikels zeven of meer granulocellen vertonen in hun grootste doorsnede, worden deze cuboïdaal. Naarmate het aantal granulocellen toeneemt, neemt het percentage afgeplatte granulocellen zeer snel af.

De tweede fase wordt gedomineerd door de proliferatie van het aantal granulocellen en de toename van de grootte van de oöcyt. Bij runderen wordt de

eerste significante groei van de oöcyt vastgesteld bij follikels met minstens 40 granulosacellen in de grootste diameter (Braw-Tal, 2002). Bij de muis en rat begint de eicelgroei reeds vanaf 10 granulosacellen in de grootste diameter (Lintern-Moore en Moore, 1979; Andersen de Wolff-Exalto en Groen-Klevert, 1980), bij het schaap en de mens vanaf 15 granulosacellen (Cahill en Mauleon, 1981; Gougeon en Chainy, 1987). Algemeen wordt aanvaard dat een normale eicelontwikkeling niet mogelijk is zonder ondersteuning van de granulosacellen. De groeisnelheid van de oöcyt is bovendien sterk positief gecorreleerd met het aantal omgevende granulosacellen (Brower en Schultz, 1982).

De regulering van follikelgroei in de eerste fase zou gebaseerd zijn op het bestaan van een evenwicht tussen lokaal geproduceerde inhibitoren en stimulators, een hypothese die ook door andere auteurs wordt weerhouden (Picton *et al.*, 1998; Fortune, 2003). Wanneer stimulators om nog onbekende redenen het overwicht halen op inhibitoren, zou een aantal primordiale follikels geactiveerd worden. In de tweede fase begint de follikel te functioneren als een autonome eenheid, waarvan de verdere ontwikkeling afhankelijk is van door de oöcyt geproduceerd Growth Differentiation Factor 9 en Bone Morphogenetic Protein 15 en door granulosacellen gesecreteerd Kit Ligand (Braw-Tal, 2002).

Aanwijzingen voor het bestaan van een overwegend inhiberend intraovarieel milieu werden ook aangereikt door experimenten waarbij stukjes ovariële cortex in cultuur werden gebracht, wat leidde tot massale activering van de primordiale follikels (zie hoger). Kandidaat-inhibitoren zijn onder andere activin A en anti-Müllerian hormoon. Activin A wordt door grotere follikels gesecreteerd en remt bij de muis de groei van primaire follikels (Mizunuma *et al.*, 1999). Anti-Müllerian hormoon is bij mannelijke foeti verantwoordelijk voor de regressie van de ducti paramesonephrici (Müllerse buizen), waaruit eileiders, uterus en het craniale deel van de vagina ontstaan. Bij vrouwelijke individuen wordt anti-Müllerian hormoon tot expressie gebracht in granulosacellen van voornamelijk pre-antrale en antrale follikels. Het remt bij de muis de initiëring van de folliculaire groei (Durlinger *et al.*, 2002). Bij anti-Müllerian hormoon knock-out muizen was de primordiale reserve vlugger uitgeput dan bij een groep controledieren door een toename van de recruterende van follikels (Fair, 2003).

Rol van gonadotropinen

De folliculaire ontwikkeling in afwezigheid van gonadotropinen is mogelijk tot in de laat pre-antrale tot vroeg antrale fase (Roche, 1996; Knight en Glister, 2001). De kritische afhankelijkheid van follikels van FSH lijkt samen te vallen met de differentiatie van granulosacellen in cumulus granulosacellen en murale granulosacellen en dus met het ontstaan van het antrum (Richards, 2001).

Niettegenstaande pre-antrale follikels zich onafhankelijk van FSH kunnen ontwikkelen, zijn FSH-receptoren reeds aanwezig op de granulosacellen van primaire follikels (Oktay *et al.*, 1997; Findlay en Drummond, 1999). Het is zodoende mogelijk dat de optimale ontwikkeling van pre-antrale follikels slechts gebeurt in aanwezigheid van gonadotropinen (Cortvrint *et al.*, 1997).

Het belang van gonadotropinen in de folliculaire ontwikkeling wordt nog gecompliceerd door de ovariële productie en secretie van factoren die op cellulair niveau de werking van de gonadotropinen moduleren. Tot deze lokale modulators behoren ondermeer factoren van de Transforming Growth Factor β -familie - met onder andere inhibine en activine - en het Insulin Like Growth Factor (IGF) systeem.

Inhibine en activine worden gesecreteerd door granulosacellen. Inhibine heeft, samen met oestradiol, een FSH-suppressieve werking via een negatief feedback systeem naar de hypofyse. Lokaal sensibiliseert het thecacellen voor luteïniserend hormoon (LH), wat leidt tot een verhoogde androgeenproductie. Activine stimuleert onder andere granulosacel proliferatie, FSH-receptorexpressie en oestrogeenproductie (Knight en Glister, 2001).

IGF heeft een synergistische werking op de gonadotropineactiviteit (Armstrong *et al.*, 2000). Het IGF-werkingsmechanisme is evenwel complex door het voorkomen van bindingseiwitten (IGFBP), die de IGF/receptor interactie verhinderen, en IGFBP-proteasen, die de bindingseiwitten neutraliseren. Het distributiepatroon van IGF-expressie vertoont bovendien grote speciesverschillen. Bij runderen kon IGF-II aangetoond worden in thecaweefsel (Armstrong *et al.*, 2000), maar het voorkomen van IGF-I is controversieel. Bij de mens is IGF-II-expressie beperkt tot granulosacellen (Zhou en Bondy, 1993). Door wijzigingen in de IGFBP-concentraties en verschillen in IGFBP-proteaseactiviteit nemen de biologische beschikbaarheid van IGF en de folliculaire respons op gonadotropinen toe naarmate de folli-

culogenese de fase van dominantie nadert (Armstrong en Webb, 1997).

Angiogenese

In de meeste volwassen weefsels komt capillaire groei slechts zelden voor; het vasculair endothelium vormt er een stabiele cel populatie met lage mitotische index (Denekamp, 1984). Neovascularisatie kan onder bepaalde omstandigheden voorkomen in adulte weefsels, zoals bij weefselgroei en/of -herstel (Klagburg en D'Amore, 1991). De vrouwelijke voortplantingsorganen vertonen periodische groei en regressie, wat gepaard gaat met drastische wijzigingen in de bloedvloeï (Reynolds *et al.*, 1992). Angiogenese komt dan ook voor als een fysiologisch proces in volwassen vrouwelijke reproductieve organen.

Het proces van neovascularisatie wordt vermoedelijk gecontroleerd door angiogene en anti-angiogene factoren (Klagburg en D'Amore, 1991). Enerzijds moet angiogenese steeds beschikbaar zijn wanneer de noodzaak zich voordoet, maar anderzijds moet het gedurende een langere periode onderdrukt worden. Ovariële follikels en corpora lutea synthetiseren angiogene factoren die vermoedelijk behoren tot de familie der Fibroblast Growth Factors en Vascular Endothelial Growth Factors (Redmer en Reynolds, 1996).

In meerdere studies kon worden vastgesteld dat de dominante follikel een meer gevasculariseerde theca-laag heeft dan de andere antrale follikels (McNatty *et al.*, 1981; Zeleznik *et al.*, 1981). Uit deze heterogene folliculaire vascularisatie, in combinatie met de aanwezigheid van angiogene factoren in de follikel, zou men kunnen besluiten dat een beter uitgebouwd capillair netwerk een belangrijke bepalende factor kan zijn bij het ontstaan van dominantie (Redmer en Reynolds, 1996).

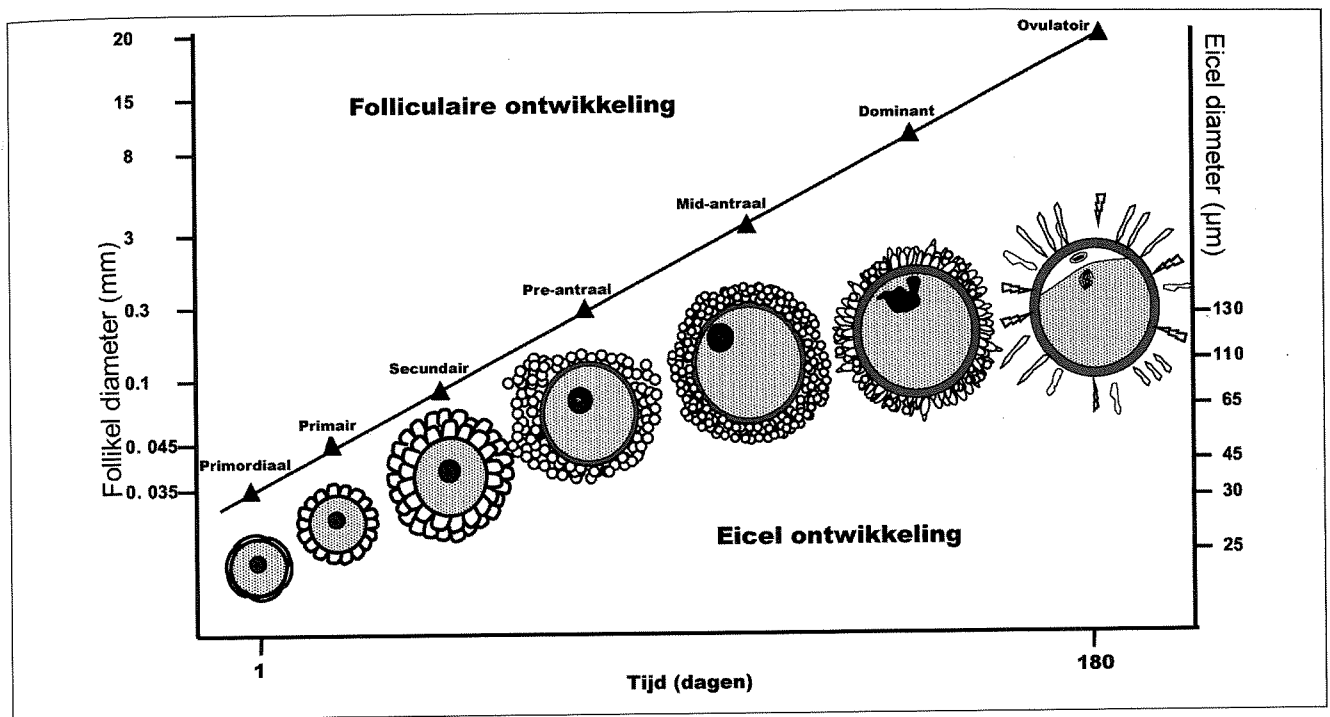
Andere onderzoekers (Wandji *et al.*, 1996; 1997) gaan nog verder en stellen hypothetisch dat lokale verschillen in bloedvloeï een rol zouden kunnen spelen in het al dan niet activeren van follikels. Dit zou een verklaring kunnen bieden voor de massale activering van primordiale follikels bij de *in vitro* cultuur van stukjes ovariële cortex (zie hoger). Aangezien de ovariële cortex weinig gevasculariseerd is (Guraya, 1985; van Wezel en Rodgers, 1996), is het milieu waarin de follikels zich *in vitro* bevinden rijker aan nutriënten en zuurstof (Fortune *et al.*, 2000).

Competentie

Bij het ontstaan van de follikels werd de oöcyt 'bevroren' in het diploteen stadium van de eerste meiotische profase. Deze eicellen zijn nog niet fertiel maar verwerven fertiliteit in een stapsgewijs proces dat aanvangt met de activering van primordiale follikels. Tijdens het ontwikkelingsproces groeit de oöcyt uit van een gemiddelde diameter van 30 μm tot een gemiddelde diameter van 130 μm , wat overeenkomt met bijna een 100-voudige volumetoename. Een dergelijke volumetoename is slechts mogelijk doordat de eicelgroei niet wordt verstoord door celdeling. De afwisseling van celgroei met celdeling is een homeostatisch mechanisme dat instaat voor het behoud van de nucleocytoplasmatische ratio (Hertwig, 1903; 1908). Op deze regel bestaan echter een aantal uitzonderingen: door blokkering van de meiose kan de oöcyt namelijk groeien zonder te delen, omgekeerd deelt een zygote (een bevruchte eicel) zonder te groeien.

Het proces van eicelmaturatie omvat het stapsgewijs verwerven van diverse competenties. Het vangt aan bij de activering van de primordiale follikels, maar wordt slechts voltooid in de laatste dagen voor de ovulatie. Meiotische competentie verwijst naar het vermogen van de eicel om de blokkage van de reductiedeling te overwinnen, ontwikkelingscompetentie naar het vermogen om de eerste fasen van de embryonale ontwikkeling door te maken. Om het resultaat van *in vitro* maturatie van eicellen te beoordelen, wordt vaak gekeken naar het al dan niet hervatten van de meiose. Meiotische competentie is nochtans geen garantie voor het bereiken van volledige ontwikkelingscompetentie. Zelfs wanneer de meiose en de aansluitende vroegste ontwikkelingen met succes worden voltooid, is een *in vitro* gematureerde eicel vaak van inferieure kwaliteit. Naast nucleaire processen bestaan er immers nog - tot op heden overwegend ongekende - cytoplasmatische processen die gezamenlijk de ontwikkelingscompetentie van de eicel bepalen (Krishner, 2004).

Tijdens de groeifase synthetiseren en accumuleren oöcyten grote hoeveelheden RNA, ribosomen en eiwitten. Het grootste gedeelte van het mRNA blijft aanwezig in het cytoplasma in een stabiele maar inactieve vorm (Tomek *et al.*, 2002). In de periode van meiotische competentie, na de LH-piek, komt hierin verandering met de activering van de eiwitsynthese en de -adenylatie of zelfs degradatie van meer dan 50% van het aanwezige mRNA (Paynton en Bacharova, 1994). Het geaccumuleerde materiaal staat in



Figuur 3. Relatie tussen folliculaire en oöcytaire ontwikkeling (naar Lussier *et al.*, 1987; en Fair, 2003).

voor een succesvolle maturatie en fertilisatie en voor de initiële celdelingen van de zygote tot het 8- à 16-cellige stadium (Fair *et al.*, 2004).

Rond het tijdstip van de transitie van pre-antrale naar antrale follikel vinden belangrijke ontwikkelingen plaats. Pre-antrale follikels zijn meiotisch incompetent en kunnen zich zodoende niet ontwikkelen voorbij het diploten van meiose I. Eicellen uit antrale follikels zullen daarentegen spontaan de meiose vervolgen wanneer ze uit de follikel worden verwijderd, en zijn dus meiotisch competent (Eppig, 2001).

Bij rodentia is de eicelgroei voltooid en heeft de oöcyt meiotische competentie verworven op het ogenblik dat in de follikel een antrum verschijnt (Eppig en Schroeder, 1989). Meiotische competentie is bij de mens en het rund niet strikt gebonden aan het verschijnen van een antrum, maar het vermogen tot meiotische competentie neemt toe met de follikelgrootte (Trounson *et al.*, 2001). Bij de mens en het rund verschijnt het antrum in follikels die 2% van de grootte van de pre-ovulatoire diameter hebben bereikt. Bij alle bestudeerde niet-rodentia wordt het vermogen om de meiose te vervolgen, verworven als de follikel een diameter van 9 tot 13% van deze diameter heeft bereikt (Gilchrist *et al.*, 1995). Runderoöcyten verwerven meiotische competentie bij een diameter van 110 à 115 µm; ontwikkelingscompetentie wordt bereikt bij een gemiddelde oöcytdiameter van 120 µm (Fair *et al.*, 1995; Otoi *et al.*,

1997). Naarmate de oöcytdiameter toeneemt, neemt ook het vermogen toe om zich na de bevruchting *in vitro* te ontwikkelen tot het blastocyststadium, tot bij 135 µm het optimum wordt bereikt (Armstrong, 2001). In figuur 3 wordt de relatie tussen eicelgrootte en follikelgrootte grafisch weergegeven.

Bij superstimulatie wordt door middel van hormonale injecties - meestal met gonadotropinen - de folliculaire ontwikkeling dusdanig beïnvloed dat per cohorte meerdere grote, 'gezonde' follikels worden geproduceerd. Door superstimulatie en daaropvolgende *in vitro* technieken tracht men de *in vivo* beperkingen van één eicel per oestrische cyclus te omzeilen. *In vitro* maturatie lijkt hierin de meest beperkende factor te zijn, aangezien slechts 35% van de gecollecteerde bovine cumulusoöcytcomplexen ontwikkelingscompetentie verwerven (Blondin en Sirard, 1995). De ont koppeling van de folliculaire en oöcytaire maturatie wordt aangehaald als mogelijke verklaring voor het geringe succes van *in vitro* maturatie (Blondin *et al.*, 1996).

Pas na de pre-ovulatoire LH-piek wordt de meiose hervat, wat zich ondermeer uit in de afbraak van het kiemblaasje, waarbij de membraan rond de oöcytkern ten gronde gaat en de kerninhoud vrijkomt in het cytoplasma. Vervolgens condenseren de chromosomen en worden de laatste fasen van meiose I voltooid. Bij de meeste mammalia wordt de meiose daarna opnieuw geblokkeerd in metafase II. De LH-piek induceert naast veranderingen in de oöcyt ook

belangrijke wijzigingen in de follikel. Cumuluscellen gaan over tot synthese van hyaluronzuur, een niet-gesulfateerd glycosaminoglycaan dat door middel van eiwitten aan de cumuluscellen wordt gebonden. Wanneer het hyaluronzuur hydrateert, vergroot de ruimte tussen de cumuluscellen en worden deze ingebed in een muceuze matrix (Eppig, 2001). Dit proces van cumulusexpansie is onderdeel van het ovulatiemechanisme en is tevens van essentieel belang voor de latere fertilisatie (Zhuo en Kimata, 2001).

BESLUIT

Door het grote aantal studies dat in recente jaren werd gewijd aan de folliculaire dynamiek, werd voor een aantal hormonen en lokale factoren het belang in de pre-antrale ontwikkeling en differentiatie in min of meerdere mate duidelijk. Uit het grote aanbod van factoren die mogelijk een rol spelen in de activering en groei van follikels, werden slechts enkele belangrijke mediators besproken.

Primordiale follikels zouden het ultieme uitgangspunt vormen voor een *in vitro* cultuur van eicellen. Hiervoor blijven evenwel nog een aantal belangrijke hindernissen bestaan, zo bijvoorbeeld het mechanisme van de activering van primordiale follikels en de rol van oöcyt en granulosa cellen in deze activering. Enkel bij de muis is men er éénmalig in geslaagd om levende nakomelingen te verwekken uitgaande van de cultuur van primordiale follikels (Eppig en O'Brien, 1996). Bij de grote huisdieren werden enkele beperkte successen geboekt waarbij reeds geactiveerde pre-antrale follikels gedurende een dertigtal dagen in cultuur konden worden gehouden (Cortvrindt en Smits, 2001).

DANKBETUIGING

De auteurs bedanken E. Wechsung en A. Houvenaghel voor het kritisch nalezen van het manuscript.

LITERATUUR

- Andersen de Wolff-Exalto E., Groen-Klevert A.C. (1980). Oocyte growth in the immature rat. *Journal of Reproduction and Fertility* 59, 187-192.
- Anderson R., Fässler R., Georges-Labouesse E., Hynes R.O., Bader B.L., Kreidberg B.A., Schaible K., Heasman J., Wylie C. (1999). Mouse primordial germ cells lacking $\beta 1$ integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 126, 1644-1655.
- Armstrong D.G., Webb R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction* 2, 139-146.
- Armstrong D.G., Gutierrez C.G., Baxter G., Glazyrin A.L., Mann G.E., Woad K.J., Hogg C.O., Webb R. (2000). Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology* 165, 101-113.
- Armstrong D.T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55, 1303-1322.
- Blondin P., Sirard M.A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocyte. *Molecular Reproduction and Development* 41, 54-62.
- Blondin P., Guilbault L.A., Coenen K., Sirard M.A. (1996). Superovulation can reduce the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 46, 1191-1203.
- Braw-Tal R., Yossefi S. (1997). Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 109, 165-171.
- Braw-Tal R. (2002). The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology* 187, 11-18.
- Brower P.T., Schultz R.M. (1982). Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Developmental Biology* 90, 144-153.
- Buehr M., McLaren A., Bartley A., Darling S. (1993). Proliferation and migration of primordial germ cells in W^e/W^e mouse embryos. *Developmental Dynamics* 198, 182-189.
- Cahill L.P., Mauleon P.A. (1981). A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* 61, 201-206.
- Cecconi S. (2002). Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives. *Journal of Reproduction and Development* 48, 431-445.
- Cortvrindt R., Smits J., Van Steirteghem A.C. (1997). Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Human Reproduction* 12, 759-768.
- Cortvrindt R., Smits J. (2001). *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals* 36, 3-9.
- Cushman R.A., Wahl C.M., Fortune J.E. (2002). Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. *Human Reproduction* 17, 48-54.
- de Loos F., Kastrop P., Van Maurik P., Van Beneden T.H., Kruij T.A. (1991). Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development* 28, 255-259.
- Denekamp J. (1984). Vasculature as a target for tumour therapy. In: F. Hammersen, O. Hudlicka (Editors). *Progress in Applied Microcirculation* (Vol. 4). Karger, Basel, pp. 28-38.

- Driancourt M.A., Reynaud K., Cortvrindt R., Smits J. (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of Reproduction* 5, 143-152.
- Durlinger A.L.L., Grijters M.J.G., Kramer P., Karels B., Ingraham H.A., Nachtigal M.W., Uilenbroek J.T.J., Grootegoed J.A., Themmen A.P.N. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076-1084.
- Elvin J.A., Yan C., Matzuk M.M. (2000). Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 159, 1-5.
- Eppig J.J., Schroeder A.C. (1989). Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* 41, 268-276.
- Eppig J.J., O'Brien M.J. (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction* 54, 197-207.
- Eppig J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829-838.
- Eppig J.J., Wigglesworth K., Pendola F.L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 2890-2894.
- Erickson B.H. (1966a). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25, 800-805.
- Erickson B.H. (1966b). Development and radio responses of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 11, 97-105.
- Fair T., Hyttel P., Greve T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development* 42, 437-442.
- Fair T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* 78, 203-216.
- Fair T., Murphy M., Rizos D., Moss C., Martin F., Boland M.P., Lonergan P. (2004). Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development* 67, 136-144.
- Findlay J.K., Drummond A.E. (1999). Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 10, 183-188.
- Fortune J.E., Kito S., Wandji S.A., Srsen V. (1997). Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. *Theriogenology* 49, 441-449.
- Fortune J.E., Cushman R.A., Wahl C.M., Kito S. (2000). The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163, 53-60.
- Fortune J.E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 78, 135-163.
- Gilchrist R.B., Nayudu P.L., Nowshari M.A., Hodges J.K. (1995). Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biology of Reproduction* 52, 1234-1243.
- Gondos B. (1978). Oogonia and oocytes in mammals. In: Jones R.E. (Editor), *The vertebrate Ovary*, Plenum Press, New York, pp. 83-120.
- Goudet G., Belin F., Bézard J., Gérard N. (1999). Intra-follicular content of luteinizing hormone receptor, α -inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biology of Reproduction* 60, 1120-1127.
- Gougeon A., Chainy G.B. (1987). Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 433-442.
- Gougeon A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* 17, 121-155.
- Guraya, S.S. (1985). Primordial follicle. In: *Biology of Ovarian Follicles in Mammals*. Springer Verlag, Berlin, pp. 3-14.
- Hertwig R. (1903). Ueber Korrelation von Zell und Kern-grosse und ihre Bedeutung für die geschlechtlich Differenzierung und die Teilung der Zelle. *Biologisches Zentralblatt* 33, 4-62.
- Hertwig R. (1908). Ueber neue Probleme des Zellenlehre. *Archiv für Zellforschung* 1, 1-32.
- Hirshfield A.N. (1991). Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of Reproduction* 44, 1157-1162.
- Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O. (1993). *Funcionele histologie*. Wetenschappelijke Uitgeverij Bunge, Utrecht, p. 547.
- Kaipia A., Hsueh A.J.W. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Reviews of Physiology* 59, 349-363.
- Klagburg M.A., D'Amore P.A. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annual Review of Physiology* 53, 217-239.
- Knight P.G., Glister C. (2001). Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121, 503-512.
- Knight P.G., Glister C. (2003). Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science* 78, 165-183.
- Krishner R.L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science* 82S, E14-E23.
- Lin P.C., Bhatnagar K.P., Nettleton G.S., Nakajima S.T. (2002). Female genital anomalies affecting reproduction. *Fertility and Sterility* 78, 899-915.
- Lintern-Moore S., Moore G.P.M. (1979). The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction* 20, 773-778.
- Lussier, J.G., Matton, P., Dufour, J.J. (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 301-307.
- Matzuk M.M. (2000). Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163, 6-66.
- McNatty K.P., Dobson C., Gibb M., Kieboom L.E., Thurley D.C. (1981). Accumulation of luteinizing hormone,

- oestradiol and androstenedione by sheep ovarian follicles. *In vivo Journal of Endocrinology* 91, 99-109.
- McNatty K.P., Fidler A.E., Juengel J.L., Quirke L.D., Smith P.R., Heath D.A., Lundy T., O'Connell A., Tisdall D.J. (2000). Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163, 11-20.
- Merchant-Larios H., Chimal-Monroy J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Progress in Clinical and Biological Research* 296, 55-63.
- Mizunuma H., Liu X., Andoh K., Abe Y., Kobayashi J., Yamada K., Yokoto H., Ibuki Y., Hasegawa Y. (1999). Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology* 140, 37-42.
- Nilsson E., Parrott J.E., Skinner M.K. (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175, 123-130.
- Nilsson E., Skinner M.K. (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *Journal of the Society Gynecologic Investigation* 8, S17-S20.
- Noden D.M., de Lahunta A. (1985). Derivates of the intermediate mesoderm: reproductive organs. In: Noden D.M., de Lahunta A. *Embryology of domestic animals*, Williams & Wilkins, Baltimore/London, pp. 322-327.
- Oktaş K., Briggs D., Gosden R.G. (1997). Ontogeny of follicle stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 3748-3751.
- Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., Suzuki T. (1997). Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48, 769-774.
- Parrott J.A., Skinner M.K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 140, 4262-4271.
- Paynton B.V., Bacharova R. (1994). Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Molecular Reproduction and Development* 37, 172-180.
- Pepling M.E., Spradling A.C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125, 3323-3328.
- Pepling M.E., Spradling A.C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology* 234, 339-351.
- Picton H., Briggs D., Gosden R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145, 27-37.
- Redmer D.A., Reynolds L.R. (1996). Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction* 1, 182-192.
- Reynolds L.P., Killilea S.D. and Redmer D.A. (1992). Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB Journal* 6, 886-892.
- Richards J.S. (2001). Perspective: The Ovarian Follicle - A Perspective in 2001. *Endocrinology* 142, 2184-2193.
- Roche J.F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis - a symposium perspective. *Reviews of Reproduction* 1, 19-27.
- Rüsse I. (1983). Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica* 24, 77-92.
- Rüsse I., Sinowatz F. (1991). Gametogenese. & Rüsse I. (1991). Harn- und Geschlechtsorgane. in: Rüsse I., Sinowatz F., *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, Verlag Paul Parey, Berlin - Hamburg, p. 51, 70 & 314.
- Senbon S., Hirao Y., Miyano T. (2003). Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from *in vitro* culture. *Journal of Reproduction and Development* 49, 259-269.
- Smitz J.E.J., Cortvrindt R.G. (2002). The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction* 123, 185-202.
- Soyal S.M., Amleh A., Dean J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127, 4645-4654.
- Tam P.P., Snow M.H. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 64, 133-147.
- Tomek W., Torner H., Kanitz W. (2002). Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 86-91.
- Trounson A., Anderiesz C., Jones G. (2001). Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction* 121, 51-75.
- van Wezel I.L., Rodgers R.J. (1996). Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biology of Reproduction* 55, 1003-1011.
- Vaskivuo T. (2002). Regulation of apoptosis in the female reproductive system. Finland, Oulo: Department of Obstetrics and Gynaecology, Doctoraal Proefschrift.
- Wandji S.A., Srsen V., Voss A.K., Eppig J.J., Fortune J.E. (1996). Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction* 55, 942-948.
- Wandji S.A., Srsen V., Nathanielsz P.W., Eppig J.J., Fortune J.E. (1997). Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Human Reproduction* 12, 1993-2001.
- Yoshida H., Takakura N., Kataoka H., Kunisada T., Okamura H., Nishikawa S. (1997). Stepwise requirement of C-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* 184, 122-137.
- Zeleznik A.J., Schiler H.M., Reichert L.E. (1981). Gonadotropin-binding sites in the Rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109, 356-361.
- Zhou J., Bondy C.A. (1993). Anatomy of the human ovarian IGF system. *Biology of Reproduction* 48, 467-482.
- Zhuo L., Kimata K. (2001). Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Structure and Function* 26, 189-196.