

# Foliculogénesis en *Bos taurus* y *Bos indicus*

Bergamo, L.Z., Costa, C.B., Sarapião, F.D., Rosenthal, R., Apolonio, E.V.P., Morotti, F. y Seneda, M.M.

## Resumen

Actualmente hay un gran interés en comprender mejor la influencia de la población folicular en el desempeño reproductivo de hembras bovinas, así como sus relaciones para con las biotecnologías reproductivas. La comprensión de esta relación en hembras *Bos taurus* y *Bos indicus* se hace necesaria, pues hay muchos trabajos realizados con animales taurinos que apuntan a una mejor fertilidad de las hembras que presentan una alta población de folículos antrales. Contradictoriamente, los estudios realizados con animales *Bos indicus* no apuntan a la misma dirección. Por lo tanto, pretendemos aclarar algunas cuestiones relacionadas con la foliculogénesis y su influencia en el comportamiento reproductivo de los bovinos *Bos taurus* y *Bos indicus*. Una mejor comprensión de estos factores puede favorecer la asociación de los parámetros reproductivos específicos a la eficiencia reproductiva.

**Palabras clave:** foliculogénesis; *Bos taurus*; *Bos indicus*; eficiencia reproductiva.

## Folliculogenesis in *Bos taurus* and *Bos indicus*

### Summary

There is currently a great interest in better understanding the influence of the follicular population on the reproductive performance of bovine females and their relationship to reproductive biotechnologies. Understanding this relationship in *Bos taurus* and *Bos indicus* females is necessary, as there are many studies in *Bos taurus* indicating that females with a high population of antral follicles have better fertility. Contradictorily, results in *Bos indicus* do not point in the same direction. Therefore, we intend to clarify some issues related to folliculogenesis and its influence on the reproductive behavior of taurus and indicus cattle. A better understanding of these factors may contribute to associate specific reproductive parameters to reproductive efficiency.

**Keywords:** folliculogenesis; *Bos taurus*; *Bos indicus*; reproductive efficiency.

## Introducción

Actualmente el campo de la reproducción animal se ha convertido en una de las áreas de la ciencia con mayor desarrollo tecnológico. Las biotecnologías asociadas con la cría de animales han demostrado un extraordinario crecimiento en los últimos años <sup>(29)</sup>. El aumento fue sostenido principalmente por estudios aplicados a los aspectos

fisiológicos de los animales domésticos. Este es un aspecto muy importante, debido a una mejor comprensión de la fisiología reproductiva, la promoción de la investigación básica, y por servir como un modelo para muchas áreas de la medicina humana <sup>(5)</sup>.

Alrededor del 90% de la población folicular ovárica está representado por los folículos prean-

Laboratorio de Reproducción Animal. Medicina Veterinaria. Universidad Estadual de Londrina, CEP 86057-970 / Paraná. [mseneda@uel.br](mailto:mseneda@uel.br)

Trabajo presentado en el Tercer Congreso Internacional de la SATE; 2 y 3 de junio de 2016, Auditorio de la UCA, Campus Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina.

# RODEOS RE-PRODUCTIVOS

+ PROTECCIÓN

+ TERNEROS

## BIOABORTOGEN H®

PREVIENE ENFERMEDADES QUE PROVOCAN  
INFERTILIDAD Y ABORTOS.

Aumente los índices de parición y preñez para lograr  
más terneros.



Asesórese con su médico veterinario o ingrese en  
[FronterasProductivas.com](http://FronterasProductivas.com)



---

trales que son responsables de la renovación continua de folículos antrales en el ovario <sup>(26)</sup>. Sin embargo, aproximadamente 99,9% de los folículos no alcanzan la etapa ovulatoria, sufriendo un proceso degenerativo o apoptótico <sup>(11)</sup>, lo que hace del ovario un órgano de baja productividad. Una de las estrategias para aumentar el uso de gametos femeninos es la producción *in vitro* de embriones.

Brasil es considerado líder en la producción *in vitro* de embriones bovinos, siendo designado como país de referencia para esta biotecnología. Una explicación para esto es el predominio de *Bos indicus* en la selección brasileña. Las hembras indicas tienen fisiológicamente una población mayor de folículos antrales en comparación con las hembras *Bos taurus* <sup>(2)</sup>. La producción de ovocitos en *Bos indicus* es aproximadamente cuatro veces mayor que *Bos taurus* <sup>(16)</sup>.

No solamente en la FIV la mayor población de folículos antrales comenzó a recibir más atención por parte de los profesionales del campo e investigadores. En todas las biotecnologías reproductivas hay un gran interés acerca de la población folicular, después de una serie de publicaciones que muestran grandes beneficios productivos y reproductivos de las hembras *taurus* con el mayor número de folículos antrales <sup>(3, 7, 8, 15)</sup>.

Sin embargo, los estudios realizados con animales *Bos indicus* han revelado resultados diferentes, dependiendo principalmente de la biotécnica <sup>(13, 25)</sup>. Por lo tanto, una mejor comprensión de las características de la foliculogénesis en *Bos taurus* y *Bos indicus* es necesaria para maximizar el rendimiento reproductivo de las ganaderías.

## Bases y conceptos de la foliculogénesis

El ovario de mamífero tiene folículos con funciones específicas esenciales para el desarrollo del ovocito. La función endocrina se considera en gran parte responsable de la producción y liberación de hormonas y/o péptidos de esteroides. Ya la función exocrina comprende el elemento esencial para el

mantenimiento de la viabilidad de los ovocitos.

Por lo tanto, el ovario se considera un ambiente ideal para el crecimiento y maduración de ovocitos inmaduros, permitiendo que el ovocito maduro llegue a la ovulación <sup>(4)</sup>. El desarrollo folicular en el ovario y el crecimiento de los ovocitos depende de una comunicación bidireccional entre los ovocitos y las células somáticas. Durante el desarrollo folicular, los ovocitos desempeñan un papel esencial en el control de la proliferación y diferenciación de células de la granulosa <sup>(1)</sup>.

Las hembras de las especies domésticas nacen con una población finita de los folículos ováricos, que también se forman durante la vida fetal durante la ovogénesis y foliculogénesis <sup>(27)</sup>. En los rumiantes, la ovogénesis se puede definir como el desarrollo y la diferenciación de las células germinales primordiales, que culmina en la formación del ovocito <sup>(22)</sup> que termina solamente después de la fertilización.

También se sabe que la formación de folículos preantrales en el bovino se produce durante el segundo trimestre de gestación, y que el tamaño de la reserva folicular es probablemente influenciado por el ambiente uterino, incluso el estado nutricional de la madre. Mossa y col. <sup>(14)</sup> estudiaron dos grupos de animales, un grupo recibió la oferta de mantenimiento y otro fue sometido a la restricción de alimentos (50% de las necesidades energéticas de mantenimiento) en los primeros 110 días de gestación. Después del nacimiento, el ovario de las terneras fue evaluado por ultrasonografía a los 10-14 días. Las terneras hijas de las vacas sometidas a restricción en la dieta fueron en promedio del 60% más bajo que el grupo control.

Aunque el concepto clásico propone que la población de folículos en los ovarios es finita y no renovable, con formación solamente durante la vida prenatal <sup>(32)</sup>, algunos estudios han sugerido la renovación de los gametos femeninos durante la vida de la hembra adulta <sup>(9, 10)</sup>. Varios estudios muestran datos muy prometedores, incluyendo el

nacimiento de ratones de ovocitos neo-formados<sup>(31)</sup>. Más recientemente, la presencia de células madre de ovario fue demostrada, con la capacidad de diferenciarse en ovocitos<sup>(30)</sup>. A pesar de los datos muy interesantes sobre este tema, los resultados se limitan a las especies murina y humana. Por otra parte, todas las pruebas experimentales se realizaron con varias técnicas y estrategias artificiales de manipulación de células. Es difícil inferir la posibilidad de neo-foliculogénesis en condiciones naturales.

### Variabilidad y repetibilidad de recuento de folículos antrales (RFA)

El recuento de folículos antrales (RFA) es una característica muy importante de la reproducción, con la aplicación práctica en la hembra bovina, y se puede determinar rápidamente y con precisión con el uso de ultrasonido. El RFA se considera muy variable entre las hembras, pero altamente repetible en el mismo individuo<sup>(3,6)</sup>. Así, después de un examen de ultrasonido, las hembras se pueden clasificar en grupos de bajo, intermedio o alto RFA. Los estudios sobre la RFA ha revelado una importancia en el comportamiento reproductivo del ganado, así como en la eficiencia de las biotecnologías reproductivas<sup>(8,19,28)</sup>.

En los animales *Bos Taurus*, la RFA está directamente relacionada con el tamaño de la reserva folicular ovárica<sup>(6)</sup>, lo que no ha sido completamente aclarado en vacas *Bos indicus*. Las hembras *Bos indicus* tienen una población mayor de folículos antrales en comparación con *Bos taurus*<sup>(2)</sup>, generando una mayor tasa de recuperación de los ovocitos viables<sup>(17)</sup>, pero no tienen una población más grande de folículos preantrales.

Los estudios de folículos antrales en *Bos taurus*<sup>(3,6)</sup>, permiten la clasificación de las hembras en tres categorías: bajo ( $\leq 15$  folículos), intermedio (15 a 25 folículos) y alto ( $\geq 25$  folículos) RFA. Estas hembras pueden tener respuesta reproductiva distinta en función de su RFA, y los mismos autores señalan que la hembra con más RFA reúne varias características relacionadas con un mejor rendimiento reproductivo, como el diámetro folicular, el tamaño de cuerpo lúteo, el nivel de progesterona, el diámetro del endometrio, tasa de gestación, intervalo más pequeño entre partos y otros.

Los datos de rodeos *Bos indicus* indican una gran variabilidad de los límites que definen las

calificaciones de RFA. El número de folículos definidos como límite para un grupo particular (Ejemplo: Bajo RFA) se puede clasificar como una posición intermedia en otro estudio. En un artículo, la RFA de los folículos  $\leq 34$  se definió como un grupo de recuento bajo, 34-53 folículos como un grupo intermedio y  $\geq 53$  folículos como el grupo de alto RFA<sup>(20)</sup>. En otro estudio se define  $<28$  folículos como el grupo bajo RFA, 28-38 folículos para el grupo intermedio y RFA  $> 38$  folículos para el grupo de alto RFA<sup>(18)</sup>. La clasificación de Santos y col.<sup>(24)</sup> es definida bajo RFA  $<10$  folículos, los folículos de 16 a 20 el grupo intermedio y  $> 25$  folículos grupo de alto RFA. Sin embargo, Rodrigues y col.<sup>(21)</sup> adoptó folículos  $\leq 32$  para el grupo de bajo entre 32 y 48 para los folículos de grupos intermedios y los folículos  $\geq 48$  para el grupo alto. Teniendo en cuenta esta variabilidad en las calificaciones de RFA (bajo, intermedio y alto) entre los trabajos experimentales, se requiere una mejor estandarización de los límites del recuento folicular. Especialmente teniendo en cuenta que las hembras taurus también se van a tener variaciones importantes entre las razas, como Holandés, Angus, Jersey, Hereford, etc. Los trabajos de aspiración de ovocitos muestran esto.

### RFA y su relación con la fertilidad de hembras sometidas a las biotecnologías IATE, SOV y PIVE

Los resultados presentados por Santos y col.<sup>(25)</sup>, indican que la población de folículos antrales en animales *Bos indicus* no influyó la tasa de concepción en la IATE, pero afectó la producción de embriones. En este estudio, la tasa de concepción de vacas Nelore sometidas a la IATF no difirió entre los grupos de alto, intermedio o bajo RFA. Pero aquellas con elevada producción de ovocitos presentaron más ventajas en comparación con vacas de intermedio o bajo RFA, resultado en mayor proporción de ovocitos viables y tasas de blastocisto. Contrariamente, en ganado cebú, estudios de nuestro grupo de investigación han revelado que vacas de bajo RFA no presentaron peor desempeño reproductivo en relación a los otros grupos. Mayor tasa de crecimiento folicular y mayores diámetros foliculares han sido descrito en hembras *Bos indicus-taurus*<sup>(23)</sup> y *Bos indicus*<sup>(12)</sup> con baja RFA. Adicionalmente, estudios relatan que la tasa de preñez (a los 60 días) utilizando IATF en



animales *Bos indicus* fue mayor para el grupo de baja RFA en relación a los de intermedio y alto recuento (datos no publicados). Estas discrepancias entre resultados de los trabajos aún no son completamente claras, aunque algunas hipótesis como aquellas relacionadas a las diferencias de aptitudes de los rebaños, linaje del rebaño, manejos y perfil nutricional pueden ser aventadas.

Según resultados presentados por Batista y col.<sup>(2)</sup>, la RFA de animales taurus e indicus están positivamente correlacionada con las concentraciones plasmáticas de AMH. Tales autores verificaron que novillas *Bos indicus* presentaron concentraciones plasmáticas de AMH mayor del que animáis *Bos taurus*, así como mayor RFA. Sin embargo, independientemente del grupo genético, los animales que presentaron alta RFA también presentaban altas concentraciones plasmáticas de AMH<sup>(2)</sup>.

## Consideraciones finales

La población de folículos antrales en bovinos constituye una característica individual, con alta tendencia a ser estable en el mismo individuo, aunque bastante distinguida entre individuos.

La literatura actual propone una correlación clara entre la RFA y mejor desempeño reproductivo para hembras taurus en la región de Europa. Sin embargo, para hembras indicas, los trabajos más recientes no constataron tal situación, habiendo mismo relatos de mejor desempeño para vacas de baja RFA.

En base a lo expuesto, se destaca la importancia, por lo menos para ganado indicus, de priorizar conceptos clásicos de mejoramiento genético en la definición de matrices. La mayor RFA puede ser útil en cuanto a aspectos cuantitativos en la producción de embriones, mientras que en las demás biotécnicas solamente los criterios ya establecidos de selección de producción deban ser considerados.

## Bibliografía

1. Araujo, V. R.; Gastal, M. O.; Figueiredo, J. R.; Gastal, E. L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 78, p. 1-14, 2014.
2. Batista, E. O. S.; Macedo, G. G.; Sala, R. V.; Ortolan, M. D. D. V.; Sa Filho, M. F.; Del Valle, T. A.; Jesus, E. F.; López, R. N. V. R.; Renno, F. R.; Baruselli, P. S. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, p. 448-452, 2014.
3. Burns, D. S.; Jimenez-Krassel, F.; Ireland, J. L. H.; Knight, P. G.; Ireland, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 53-62, 2005.
4. Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P. R.; Amorim, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais – Moifópa. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 1. ed. São Paulo: Roca, 340p, 2002.
5. Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P. R.; Amorim, C. A.; Silva, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Goncalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, v. 16, p. 303-327, 2008.
6. Ireland, J. J.; Ward, F.; Jimenez-Krassel, F.; Ireland, J. L. H.; Smith, G. W.; Lonergan, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, v. 22, p. 1687-1695, 2007.
7. Ireland, J. L. H.; Scheetz, D.; Jimenez-Krassel, F.; Themmen, A. P. N.; Ward, F.; Lonergan, P.; Smith, G. W.; Perez, G. I.; Evans, A. C. O.; Ireland, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, v. 79, p. 1219-1225, 2008.
8. Ireland, J. J.; Smith, G. W.; Scheetz, D.; Jimenez-Krassel, F.; Folgera, J. K.; Ireland, J. L. H.; Mossa, F.; Lonergan, P.; Evans, A. C. O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, p. 1-14, 2011.
9. Johnson, J.; Canning, J.; Kaneko, T.; Pru, J. K.; Tilly, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v. 428, p. 145-150, 2004.
10. Johnson, J.; Bagley, J.; Skasnik-Wikiel, M.; Lee, H. J.; Adams, G. B.; Nikura, Y.; Tschudy, K.S.; Tilly, J.C.; Cortes, M.L.; Eorkert, R.; Spitzer, T.; Iacomini, J.; Scadden, D. T.; Tilly J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral. *Cell*, v. 122, p. 303-315, 2005.
11. Matsuda, F.; Imque, N.; Manabe, N.; Ohkura, S. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *Review. Journal of Reproduction and Development*, v. 58, p. 44-50, 2012.
12. Morotti, F.; Sanches, B. V.; Pontes, J. H. F.; Basso, A. C.; Siqueira, E. R.; Lisboa, L. A.; Seneda, M. M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF pro-

- gram using reverse-sorted sêmen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, v. 81, p. 696-701, 2014.
13. Morotti, F.; Barreiros, T. R. R.; Machado, F. Z.; Gonzalez, S. M.; Marinho, L. S. R.; Seneda, M. M. Is the number of antral follicles na interesting selection criterium for fertility in cattle? *Animal Reproduction*, v. 12, n. 3, p. 479-486, 2015.
  14. Mossa, F.; Kenny, D.; Jimenez-Krassel, F.; Smith, G. W.; Berry, D.; Butler, S.; Fair, T.; Lonergan, P.; Ireland, J. J.; Evans, A. C. O. Undernutrition of Heifers During the First Trimester of Pregnancy Diminishes Size of the Ovarian Reserve in Female Offspring. *Biology of Reproduction*, v. 81, p. 135, 2009.
  15. Mossa, F.; Walsh, S. W.; Butler, S. T.; Berry, D. P.; Carter, F.; Lonergan, P.; Smith, G. W.; Ireland, J. J.; Evans, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm 35 in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 2355-2361, 2012.
  16. Pontes, J. H. F.; Nonato-Junior, I.; Sanches, B. V.; Ereno-Junior, J. C.; Uvo, S.; Barreiros, T. R. R.; Olivera, 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*, v. 71, p. 690-697, 2009.
  17. Pontes, J. H. F.; Melo-Sterza, F. A.; Basso, A. C.; Ferreira, C. R.; Sanches, B. V.; Rubin, K. C.; Seneda, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, v. 75, p. 1640-1646, 2011.
  18. Pinheiro, V. G.; Ereno, R. L.; Razza, E. M.; Barros, C. M.; Nogueira, M. F. Is the low number of ovarian antral follicles  $\geq 3$ mm in diameter associated with low fertility in lactating nelore cows? *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27(1), p. 99-100, 2014 (Abstract).
  19. Rico, C.; Drouilhet, L.; Salvetti, P.; Dalbies-Tran, R.; Jarrier, P.; Touze, J-L.; Pillet, E.; Ponsart, C.; Fabre, S.; Monniaux, D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reproduction Fertility Development*, v. 24, p. 932-944, 2012.
  20. Rodrigues, A. S.; Oliveira, S. N.; Loiola, M. V. G.; Andrade, B. H. A.; Ferraz, P. A.; Ayres, M. C. C.; Bittencourt, R. F.; Chalhoub, M.; Filho, A. L. R. Fertilidade de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 7, p. 801-804, 2013.
  21. Rodrigues, A. S.; Oliveira, S. N.; Loiola, M. V. G.; Ferraz, P. A.; Chalhoub, M.; Bittencourt, R. F.; Araujo, E. A. B.; Bittencourt, T. C. B. S. C.; Filho, A. L. R. Contagem de folículos antrais em fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. *Ciência Rural*, v. 45, n. 4, p. 711-717, 2015.
  22. Russe, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca anatomica*, v. 24, p. 77-92, 1983.
  23. Santos, G. M. G.; Silva-Santos, K. C.; Siloto, L. S.; Morotti, F.; Marcantonio, T. N.; Marinho, L. S. R.; Thasmo, R. L. O.; Koetz, J. R. C.; Cintra, D. M. L.; Seneda, M. M. Dinâmica folicular em fêmeas bovinas de alta, média e baixa contagem de folículos antrais: resultados preliminares. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 40, p. 422, 2012 (Abstract).
  24. Santos, G. M. G.; Silva-Santos, K. C.; Barreiros, T. R. R.; Morotti F.; Sanches, B. V.; Moraes, F. L. Z.; Blaschi, W.; Seneda, M. M. High numbers of antral follicles influence the in vitro embryo production, but not the conception rate of fixed-time artificial insemination in nelore cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, p. 206-206, 2014 (Abstract).
  25. Santos, G. M. G.; Silva-Santos, K. C.; Barreiros, T. R. R.; Morotti, F.; Sanches, B. V.; Moraes, F. L. Z.; Blaschi, W.; Seneda, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 165, p. 17-21, 2016.
  26. Saumande, J. Ovogenèse et folliculogênese. *Recueil de Medecine Veterinaire*, v. 157, p. 29-38, 1981.
  27. Saumande, J. La folliculogênese chez les ruminants. *Recueil de Medecine Veterinaire*, v. 167, p. 205-218, 1991.
  28. Silva-Santos, K. C.; Santos, G. M. G.; Koetz Junior, C.; Morotti, F.; Siloto, L. S.; Marcantonio, T. N.; Urbano, M. R.; Oliveira, R. L.; Lima, D. C. M.; Seneda, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In Vivo – of *Bos indicus*-taurus Donors from Weaning to Yearling Ages. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 49, p. 228-232, 2014.
  29. Stroud, B. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, v. 29, p. 14-23, 2011.
  30. White, Y. A. R.; Woods, D. C.; Takai, Y.; Ishihara, O.; Seki, H.; Tilly, J. L. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature medicine*, v. 18, p. 413-421, 2012.
  31. Zou, K.; Yuan, Z.; Yang, Z.; Luo, H.; Sun, K.; Zhou, L.; Xiang, J.; Shi, L.; Yu, Q.; Zhang, Y.; Hou, R.; Wu, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature cell biology*, v. 11, p. 631-636, 2009.
  32. Zuckerman, S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 6, p. 63-108, 1951.