

## **Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião**

*Bovine oocyte maturation and influence on subsequent embryonic developmental competence*

**F.P. Gottardi<sup>1</sup>, G.Z. Mingoti<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Curso de Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba, SP, 16050-680, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [gmingoti@fmva.unesp.br](mailto:gmingoti@fmva.unesp.br)

### **Resumo**

Para melhor compreender a importância da qualidade da maturação do oócito para o embrião, é necessário que sejam bem definidas as diversas formas de competência adquiridas pelo oócito durante o processo de maturação. Basicamente ocorrem três diferentes processos de maturação no oócito: eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares. Os maiores problemas que impedem o avanço e a melhoria dos sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos relacionam-se à relativa escassez de conhecimento em como o oócito adquire a competência durante o processo de maturação. Nesta revisão, serão considerados: (i) a maturação e a aquisição da competência em oócitos bovinos, com especial enfoque na maturação nuclear e citoplasmática e nas atividades que coordenam esses processos; (ii) os sistemas de cultivo *in vitro* de oócitos bovinos, os suplementos utilizados no meio de maturação e os cuidados durante esse processo.

**Palavras-chave:** bovino, cultivo *in vitro*, maturação *in vitro*, oócito.

### **Abstract**

*To better understand the contribution of the oocyte maturation quality to the embryo, it is important to define more precisely the different types of competence expressed by oocytes. Three different types of maturation processes are observed in the oocyte: nuclear, cytoplasmic and molecular. The major problems that hinder the advancement and improvement of in vitro production systems of bovine embryos are related to the relative lack of knowledge about acquisition of oocyte competence during maturation. This review will consider: (i) maturation and acquisition of developmental competence in bovine oocytes, focused on nuclear and cytoplasmic maturation, and on the activities that control such processes; (ii) in vitro culture systems, supplements of maturation media, and the precautions during this process.*

**Keywords:** cattle, in vitro maturation, in vitro culture, oocyte.

### **Introdução**

Apesar dos muitos esforços para se melhorar a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos para fins científicos e/ou comerciais, a sua eficiência ainda é relativamente baixa. Apenas 35-40% dos oócitos bovinos maturados (MIV), fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) desenvolvem-se até o estágio de blastocisto (Mayes e Sirard, 2001; Sirard et al., 2006) e, dentre estes, somente 30% chegam a termo após transferência para receptoras (Ward et al., 2002; Park et al., 2005). As baixas taxas são determinadas por: 1) fatores ambientais e inerentes ao próprio sistema de PIV de embriões, que atuam sobre todas as suas etapas (maturação, fecundação e cultivo); 2) remoção do oócito do ambiente folicular, com consequente perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre oócito e células foliculares. A soma desses fatores determina o prejuízo na qualidade e competência oocitária, levando à baixa produção de blastocistos, quando comparada àquela obtida *in vivo*.

Outras evidências demonstram que o potencial de desenvolvimento do oócito pode ser significativamente influenciado pelas condições fisiológicas da doadora, tais como estágio do ciclo estral, estágio do desenvolvimento folicular, dentre outros (Lonergan e Fair, 2008). Embora muitos desses fatores não sejam ainda conhecidos, deve-se considerar que o desenvolvimento do oócito dentro do folículo é controlado por vários fatores endócrinos e locais, como hormônios, fatores de crescimento e peptídeos. Assim, as condições de cultivo *in vitro* para maturação nuclear e citoplasmática do oócito certamente têm um papel fundamental sobre a aquisição da competência (chamada também de capacitação oocitária), que é essencial para o desenvolvimento embrionário. Portanto, para o estabelecimento de um sistema de cultivo que possibilite a produção de um maior número de embriões de boa qualidade, é necessária a compreensão dos mecanismos envolvidos na maturação de oócitos.

## Maturação de oócitos

O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Neste sentido, é uma das fases mais importantes da PIV de embriões, pois é nesse período que o oócito adquire capacidade para prosseguir nos próximos eventos (FIV e CIV).

Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GBVD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (Meinecke et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (Sirard et al., 1998), modificações moleculares (Kubelka et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (Stojkovic et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang et al., 2003). As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose (De Sousa et al., 2004; Dekel, 2005; Dumont et al., 2005). Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as proteínas do complexo MPF (fator promotor da maturação) e da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos). Dessa forma, vários fatores atuam de maneira a tornar o oócito imaturo hábil à fecundação e ao desenvolvimento de um embrião viável.

Apesar de sua complexidade, a maturação oocitária pode ser realizada *in vitro* após a remoção do oócito imaturo do folículo e do cultivo em meio e ambiente adequados (Edwards, 1965). No procedimento *in vitro*, os oócitos retornam à maturação meiótica quando são removidos do folículo e cultivados em meio adequado (Gordon, 1994). Por outro lado, *in vivo*, é durante a fase de desenvolvimento folicular que o oócito adquire a competência para o posterior desenvolvimento (Lonergan et al., 2003). A maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (Xu e Bracket, 1988).

## Maturação nuclear

A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose a partir do estágio dictiata (diplóteno da prófase da primeira meiose - prófase I) até a fase de metáfase II (M II; Mingoti et al., 1995).

*In vivo*, oócitos adquirem a competência meiótica durante sua fase de crescimento, e isso ocorre simultaneamente ao desenvolvimento folicular. Os oócitos são mantidos no estágio de vesícula germinativa (GV) no ambiente folicular até que ocorra o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, o que estimula a maturação do oócito e induz a alterações fisiológicas na atividade das células do cumulus (Fair, 2003; Rodriguez e Farin, 2004). Sob a influência dos hormônios gonadotróficos, o oócito recomeça o ciclo celular a partir da fase de diplóteno da prófase I (estádio dictiata), passa pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I (término da primeira divisão meiótica) e progride até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (Meinecke et al., 2001). No intervalo que compreende os estádios de prófase I a metáfase II, os cromossomos se condensam e o envelope nuclear é desfeito (GVBD), marcando o início da maturação nuclear (Meinecke et al., 2001; Jones, 2004). Na sequência, os cromossomos homólogos são divididos em dois grupos, sendo que metade do número original de cromossomos permanece no oócito (célula haploide) e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar. Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente (Can et al., 2003), gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra maior, o oócito secundário (Fig. 1). Após a maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (M II) até a fecundação (Mayes e Sirard, 2001).

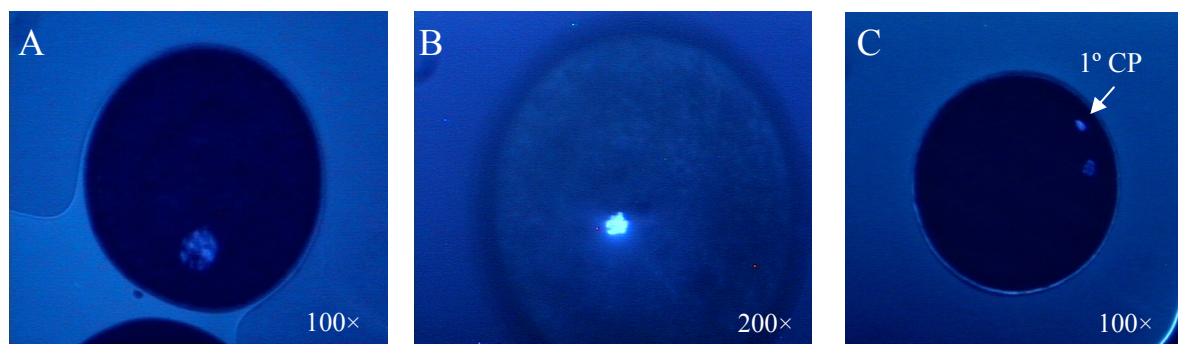


Figura 1. Fotomicrografia das diversas fases da maturação nuclear de oócitos bovinos observados corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscópio de epifluorescência. A) Oócitos em VG: cromossomos descondensados; B) Oócitos em metáfase I: cromossomos altamente condensados. C) Oócitos em metáfase II: cromossomos condensados na placa metafásica e primeiro corpúsculo polar (1° CP).

Fonte: Gottardi (2009).

Os fatores da ativação dos oócitos maduros (natural – pela fecundação, ou artificial – por meio de drogas) vão promover o término da segunda divisão meiótica, que se caracteriza pela progressão da M II até a fase de telófase II e extrusão do segundo corpúsculo polar. Após a ativação, o zigoto continua seu desenvolvimento por divisão mitótica.

### Maturação citoplasmática

As alterações metabólicas que ocorrem durante a maturação citoplasmática do oócito são processos altamente complexos que envolvem vários eventos simultâneos, como síntese de proteínas (Sirard et al., 1998), modificações moleculares (Kubelka et al., 2000) e migração e reorganização de organelas no citoplasma (Stojkovic et al., 2001).

#### *Síntese de proteínas*

*In vivo*, a maturação do citoplasma em oócitos é adquirida após uma série de processos preparatórios que envolvem a transcrição e consequente tradução de transcritos durante a prófase meiótica (Hyttel et al., 1997). A maioria dos RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) presentes no oócito é sintetizada e acumulada durante o período de crescimento oocitário (De Sousa et al., 1998). Isto ocorre porque a retomada da meiose envolve a condensação dos cromossomos, o que resulta em um súbito bloqueio da transcrição nuclear e em profundas modificações no padrão de neossíntese proteica (Wu et al., 1996; Lonergan et al., 1997). Assim, até que a transcrição do DNA do embrião se torne ativa (o que ocorre após a transição materno-zigótica), o desenvolvimento do oócito, zigoto e embrião de menos de 16 células dependem do pool de RNAm e das proteínas acumuladas para suportar todas as modificações bioquímicas, moleculares e estruturais do oócito que ocorrem durante a maturação (De La Fuente e Eppig, 2001; Gandolfi e Gandolfi, 2001; Lonergan et al., 2003).

Marcantes alterações na síntese e fosforilação de proteínas são observadas no oócito bovino (Motlik et al., 1998) e têm papel de ordenar a sequência de eventos que culminam com a maturação oocitária (Wu et al., 1996; Khatir et al., 1998). Ao longo da progressão da meiose durante a MIV de oócitos bovinos, observam-se quatro fases de síntese proteica: proteínas necessárias para GVBD; para progressão até M I; para progressão até M II; e, finalmente, para manutenção em M II (Sirard et al., 1998). Como exemplo, uma proteína de 28 kDa presente no oócito entre 0 e oito horas de cultivo parece estar envolvida na transição do estágio de GVBD para M I. Após quatro a 20 horas de cultivo, há o aparecimento de uma proteína de 48 kDa, cuja síntese cai novamente após 20 horas de cultivo. Outra proteína de 67 kDa, cuja síntese aumenta por volta de 16 horas de cultivo, parece influenciar a progressão da meiose até a fase de M II. Ao final da maturação de oócitos bovinos, há ainda a diminuição de uma proteína de 45 kDa (Khatir et al., 1998), identificada como actina, que é um dos maiores produtos sintetizados pelo oócito imaturo (Schroeter et al., 1995). A diminuição da síntese desta proteína parece ser uma característica essencial do processo normal de maturação (Le Gal et al., 1992).

#### *Maturação molecular*

Durante a maturação citoplasmática, um aumento pronunciado na atividade das cinases inicia uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteína específica. As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são uma família de serina/treonina cinases envolvidas na regulação do ciclo celular (CDK1, 2, 3, 4, 6 e 7), na transcrição (CDK7, 8 e 9) ou na função neuronal (CDK5; Schang, 2004; Mapelli et al., 2005). A atividade da CDK é dependente da interação com uma ciclina, cujos níveis são regulados sequencialmente para assegurar que as fases do ciclo celular prossigam na ordem correta (Arris et al., 2000). Exemplos importantes de cinases são o fator promotor de maturação (MPF) e a família da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK; Motlik et al., 1998). Os oócitos em crescimento desenvolvem primeiramente a habilidade de ativar o MPF e, posteriormente, de ativar a via MAPK. Somente os oócitos com o crescimento completo possuem competência para ativar efetivamente as duas vias do ciclo celular.

#### *Inibidor de maturação oocitária*

Complexos-cumulus-oócito (COCs) removidos de folículos antrais e cultivados *in vitro* retomam a meiose espontaneamente, mesmo na completa ausência de hormônios (Pincus e Enzmann, 1935), provavelmente pela simples remoção de algum fator inibitório presente no folículo íntegro. Foi sugerido que um dos fatores que impedem o oócito de sofrer maturação meiótica espontânea *in vivo* é o inibidor da maturação oocitária (OMI), um polipeptídeo encontrado no fluido folicular de ovários de uma variedade de mamíferos (Wassarman e Albertini, 1994). Estudos sugerem que o OMI seja produzido pelas células foliculares, seja teca e/ou granulosa (Sirard et al., 1998). Kotsuji et al. (1994) demonstraram que o fator inibidor da meiose em oócitos bovinos é sintetizado pelas células da granulosa, mas que as células da teca contribuem na amplificação desse sinal.

### *Monofosfato de Adenosina cíclica (AMPc)*

O mecanismo que envolve o reinício da meiose também está associado à redução das concentrações de AMPc (Conti et al., 1998). O AMPc é uma molécula sinalizadora intracelular que exerce um importante controle na meiose em mamíferos, anfíbios e em alguns invertebrados (Bilodeau-Goeseels, 2003). A redução do AMPc no interior do oócito parece estar envolvida com a ruptura da vesícula germinativa, ao menos *in vitro*. Assim, os níveis elevados do AMPc dentro do oócito mantêm o bloqueio meiótico, visto que a redução do AMPc é um sinal necessário para a maturação oocitária (Conti et al., 1998; Eysers et al., 2005).

### *Fator Promotor de Maturação (MPF)*

O MPF é uma cinase envolvida na divisão celular e na regulação do ciclo de transição da célula G2/M de todas as células eucarióticas. É um dos principais reguladores das alterações que ocorrem durante a maturação oocitária, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas (Kim et al., 2000; Kano et al., 2000; Krischek e Meinecke, 2002; Lefebvre et al., 2002).

A ativação do MPF é também um ponto chave da retomada da meiose em oócitos, que corresponde à transição da G2/M (Eppig et al., 1996). Essa ativação é um processo two-steps que envolve a formação de um complexo entre a subunidade da cinase (p34<sup>cdc2</sup> ou CDK1) e uma subunidade regulatória (ciclina B). Uma vez formado, esse complexo pode ser ativado pela desfosforilação da treonina 14 e de resíduos da tirosina 15 da subunidade p34. Assim, em bovinos, a atividade do MPF requer tanto a neossíntese proteica como as cascatas de fosforilação/desfosforilação. A estabilidade da atividade do MPF pode ser prevenida por drogas que agem nesses dois níveis (Mermillod et al., 2000).

A variação da atividade do MPF pode ser detectada nos oócitos bovinos durante a maturação. Sua atividade é baixa no estágio de GV, passando a ser observada no início da GVBD. Alcança um pico em M I, declina sua atividade durante a transição entre os estádios de M I e M II (Kubelka et al., 2000) e eleva-se novamente para a entrada do oócito em M II. Sua inativação nos oócitos em estágio de M II é induzida pela fecundação ou pela ativação paternogenética (Kikuchi et al., 2000; Kubelka et al., 2000; Abrieu et al., 2001; Ledan et al., 2001).

O processo de desorganização do heterodímero do complexo MPF independe da sua ativação catalítica, que é causada geralmente pela proteólise da ciclina B. Em oócitos fecundados de camundongos e de suínos, a degradação da ciclina B foi claramente relacionada com a inativação do complexo MPF (Kikuchi et al., 1999).

### *Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (MAPKs)*

Outro grupo de proteínas que estão envolvidas na progressão da meiose são as MAPKs, pertencentes à família das serina/treonina cinases (Kubelka et al., 2000). Essas proteínas são ativadas por sinais extracelulares e, por esta razão, a MAPK também é chamada de ERK (cinase regulada por sinal extracelular – suas variantes, ERK1/2 – p44/p42 kDa; Nebreda e Ferby, 2000; Krischek e Meinecke, 2002). A ampla faixa de atuação das MAPKs é mediada por fatores de crescimento e por soro, com uma ativação menor pelo estresse, pelo efeito osmótico e pela desorganização dos microtúbulos. Assim, também está relacionada à fosforilação de diversos substratos, incluindo fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. As MAPKs também catalisam a fosforilação e a ativação de diversas proteínas cinases, denominadas de proteínas cinases ativadas pelas MAPKs, que representam um adicional enzimático de vários espectros em diferentes células (Roux e Blenis, 2004).

A via MAPK é ativada universalmente durante a maturação meiótica em oócitos de vertebrados. A ativação da MAPK em oócitos bovinos ocorre após oito horas de cultivo *in vitro* e apresenta um aumento gradual até 12–14 horas, mantendo-se estável até o final da maturação (Kubelka et al., 2000). As duas principais isoformas (ERK1/2) da MAPK são ativadas com a proximidade do rompimento da VG em oócitos bovinos (Kubelka et al., 2000). Isso sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose, mas é essencial em eventos pós-rompimento da VG (Kano et al., 2000; Lefebvre et al., 2002). Porém, a injeção de MAPK ativa em oócitos de suíno ou de bovino induz ao rompimento da VG, indicando que essa proteína promove o reinício da meiose em condições especiais (Inoue et al., 1998).

Há evidências de que as proteínas da família MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) e a PKC (proteína cinase C) são responsáveis pela estabilidade dos microtúbulos, mantendo o fuso meiótico estável em oócitos de ratos (Horne e Guadagno, 2003; Tong et al., 2003).

### *Trifosfato de Adenosina (ATP)*

Sabe-se que o ATP é necessário para viabilizar várias funções celulares incluindo motilidade, manutenção da homeostasia e regulação da sobrevivência celular. A função do ATP na aquisição da competência

meiótica do oócito foi analisada em muitas espécies, como, por exemplo, bovinos (Stojkovic et al., 2001) e camundongos (Van Blerkom et al., 1995). Stojkovic et al. (2001) demonstraram que o nível de ATP após MIV é maior em oócitos de melhor classificação morfológica do que naqueles pobremente classificados.

Trabalhos anteriores descrevem um significativo aumento progressivo do nível de ATP em oócitos do começo (estágio de GV) até o final (M II) da MIV (Stojkovic et al., 2001; Brevini et al., 2007). Outros trabalhos associam a maior taxa de produção de embriões com grandes concentrações de ATP (Stojkovic et al., 2001; Van Blerkom et al., 1995), indicando que o nível de ATP é responsável pela capacidade de desenvolvimento embrionário após a FIV.

No entanto, o valor exato da concentração de ATP no oócito foi caracterizado apenas em humanos, nos quais foi encontrada a necessidade de uma concentração maior que 2 pmol ATP/oócito para suportar um bom desenvolvimento embrionário até a implantação (Van Blerkom et al., 1995).

#### *Migração e redistribuição de organelas no citoplasma*

A migração e a reorganização de organelas durante a maturação citoplasmática são coordenadas por uma rede de microtúbulos. Organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias e os grânulos corticais exercem importantes funções durante a maturação e a fecundação do oócito. Devido a isso, durante a maturação, essas organelas migram e posicionam-se no citoplasma em locais mais apropriados para iniciar suas atividades específicas.

#### *Microtúbulos*

Microtúbulos são filamentos altamente dinâmicos, já que, constantemente, ocorre a adição (polimerização) ou a remoção (despolimerização) de novas unidades de tubulina  $\alpha$  e  $\beta$ . Os microtúbulos estão envolvidos na manutenção da forma celular e na movimentação de moléculas e organelas celulares. Durante a maturação de oócitos de mamíferos, os centrossomos são responsáveis pela regulação coordenada da intensa reorganização dos microtúbulos durante os eventos nucleares e citoplasmáticos (Kim et al., 2000; Can et al., 2003; Sun et al., 2004).

Duas populações de microtúbulos foram identificadas em ratos: uma está ligada ao rearranjo e à conformação do DNA e outra está restrita ao citoplasma. Durante a MIV de oócitos bovinos, é formada uma rede de microtúbulos somente próxima ao DNA condensado a qual não é detectada no citoplasma (Kim et al., 2000). Já em oócitos suínos, uma rede de microtúbulos aparece no citoplasma entre 24-28 horas de MIV, mas, no final da maturação, não é mais visualizada.

A translocação de organelas, proteínas e RNAm para áreas específicas dentro do citoplasma requer a presença da rede de microtúbulos, mas também de proteínas motoras, como as cinesinas (Cohen, 2002), que transportam moléculas através da célula por movimento ao longo dos microtúbulos, acompanhando os microtúbulos durante a maturação de oócitos suínos (Brevini et al., 2007).

A rede de microtúbulos e as proteínas cinesinas não foram verificadas durante a maturação de oócitos suínos com baixa competência de desenvolvimento. Assim, pode-se suspeitar que essa ausência leve a uma maturação citoplasmática incompleta e reflita em uma alteração da compartimentalização do ooplasma e na distribuição de organelas como as mitocôndrias e os grânulos corticais. Portanto, a rede de microtúbulos deve estar relacionada à habilidade do oócito em suportar o desenvolvimento do embrião.

#### *Redistribuição de mitocôndrias e potencial de membrana mitocondrial*

As mitocôndrias constituem a central bioenergética da célula, cuja função define a competência funcional dos oócitos. São organelas especializadas que ocupam uma porção substancial do volume citoplasmático das células de origem materna. As mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte da energia celular em forma de ATP por fosforilação oxidativa por meio do metabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos contidos no citoplasma (Wilding et al., 2001; Cummins, 2004). Nos oócitos em geral, há uma grande concentração de mitocôndrias para suportar uma taxa mais elevada de síntese de moléculas dos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento. A eficiência da matriz mitocondrial na conversão do piruvato em ATP é requerida para o processo de maturação e divisão celular (Wilding et al., 2001). A inabilidade das mitocôndrias de aumentarem e/ou acumularem ATP tem sido ligada ao desenvolvimento anormal ou ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (Steuerwald et al., 2000).

Durante a mitose, as mitocôndrias são distribuídas aleatoriamente entre as células-filhas. No decorrer da oogênese, há um aumento substancial no número de mitocôndrias (6.000 para 193.000 mitocôndrias no oócito em humanos), com uma variação expressiva entre oócitos do mesmo estágio de desenvolvimento (Reynier et al., 2001; Cummins, 2004). Porém, se os blastômeros embrionários não receberem uma população suficiente de mitocôndrias para produção de ATP, podem tornar-se disfuncionais e fragmentados (Cummins, 2004). Há uma correlação similar entre o potencial para o desenvolvimento, o índice de ATP e a função mitocondrial tanto nos

oócitos quanto nos embriões bovinos (Stojkovic et al., 2001).

O metabolismo das mitocôndrias tem sido caracterizado por distintos padrões de distribuição dessa organela, bem como pelo potencial de suas membranas em diferentes estágios da maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário. No entanto, padrões ainda são incertos no desenvolvimento oocitário e embrionário de várias espécies (Cummins et al., 2004; Tarazona et al., 2006).

Vários estudos têm usado corantes fluorescentes como JC-1 para determinar a correlação existente entre um bom desenvolvimento oocitário e embrionário e a atividade metabólica da mitocôndria (Wilding et al., 2001; Van Blerkom et al., 2002). A atividade mitocondrial é analisada pelo potencial de suas membranas. Estudos recentes mostram que a atividade mitocondrial pode estar relacionada à competência do oócito (Van Blerkom et al., 2002; Tarazona et al., 2006), uma vez que o potencial de membrana mitocondrial em oócitos imaturos é menor do que o observado em oócitos maduros (Fig. 2).

A distribuição das mitocôndrias durante a maturação está bem caracterizada em oócitos de mamíferos. Em estágio de GV, as mitocôndrias são encontradas predominantemente na periferia do citoplasma e com pequenos grupos dispersos mais ao centro do ovócito (Hyttel et al., 1997; Sun et al., 2001; Adona et al., 2008). Em oócitos em estágio de M II, as mitocôndrias ocupam posição mais centralizada no citoplasma (Hyttel et al., 1997; Sun et al., 2001; Adona et al., 2008; Fig. 2).

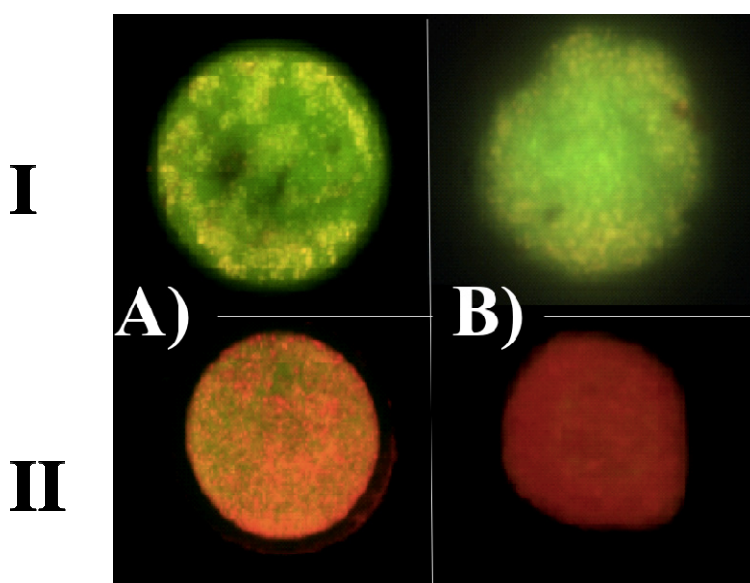


Figura 2. Fotomicrografia da distribuição e potencial das mitocôndrias de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência (aumento 200×). I) Mitocôndrias sem potencial de membrana, presentes no citoplasma do oócito; II) Mitocôndrias com potencial de membrana, presentes no citoplasma do oócito; A) Oócito imaturo com distribuição predominantemente periférica das mitocôndrias; B) Oócitos maduro com distribuição geral das mitocôndrias.

Fonte: Gottardi (2009).

#### *Redistribuição dos grânulos corticais*

Os grânulos corticais (GC) presentes no citoplasma do oócito são vesículas secretoras não renováveis, pois seu conteúdo não é mais sintetizado após a liberação promovida pela penetração do espermatozoide. Produzidos a partir do complexo de Golgi, estão presentes apenas nos gametas femininos de todos os mamíferos, na maioria dos vertebrados e em muitos invertebrados (Wessel et al., 2001). Seu conteúdo é constituído de uma população de moléculas que inclui proteases, glicosidases, enzimas e proteínas estruturais, as quais contribuem na modificação da matriz extracelular (zona pelúcida) existente nos oócitos a fim de oferecer uma barreira física e bioquímica para o bloqueio da polispermia (Wessel et al., 2001).

Os GC são formados nos oócitos em crescimento, mas sua redistribuição ocorre no período da maturação (Hyttel et al., 1997). Inicialmente, os GC podem ser identificados em pequenos grupos (clusters) pelo citoplasma dos oócitos em estágio de GV. Sua migração para a periferia do oócito ocorre durante o avanço da maturação. Quando o oócito atinge o estágio de M II, os GC estão distribuídos no córtex, próximos à membrana plasmática (Fig. 3; Wessel et al., 2001; Velilla et al., 2004; Adona et al., 2008).

Uma cascata de sinais desenvolvidos durante a maturação é responsável pela exocitose dos grânulos

corticais, denominada reação cortical (Sun, 2003). Estudos têm sugerido que a exocitose do GC está ligada a proteínas dependentes de cálcio (Abbott e Ducibella, 2001) e à transição de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular, que ocorre com a fusão espermatozoide-oócito (Wang et al., 2003). Entre as proteínas que atuam como receptores e segundo-mensageiros nessa cascata, destacam-se o inositol 1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ), a proteína kinase C (PKC), o diacilglicerol (DAG) e a proteína G (Wu et al., 1996). Outros fatores, como a calmodulina dependente de kinase II (CaMKII) e o número de retículo endoplasmático cortical, os quais são cogitados como estoques de cálcio em oócito maduro, também estão diretamente envolvidos (Abbott e Ducibella, 2001).

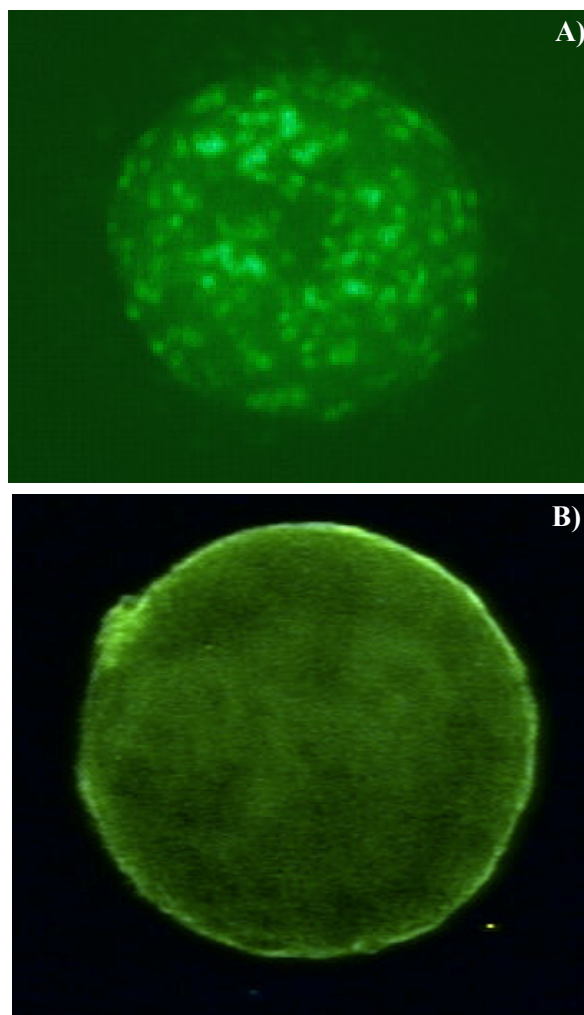


Figura 3. Fotomicrografia da distribuição dos grânulos corticais (GCs) de oócitos bovinos observados sob microscópio de epifluorescência (aumento 200×). A) Oócito imaturo com distribuição geral em cluster dos GCs; B) Oócito maduro com distribuição periférica dos GCs.

Fonte: Gottardi (2009).

#### **Aumento da eficiência no cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos**

Atualmente, as pesquisas realizadas com o objetivo de se aumentar a eficiência do desenvolvimento de oócitos cultivados *in vitro* têm recebido dois principais enfoques: a adição de substâncias promotoras de crescimento ao meio de maturação; e a tentativa de simulação das condições intrafoliculares, mantendo-se os oócitos em bloqueio meiótico com inibidores de maturação nuclear, numa tentativa de proporcionar mais tempo para aquisição da capacitação do oócito.

#### **Meios e suplementos para cultivo de maturação *in vitro***

Nutrientes, atmosfera, osmolaridade e pH são fatores que devem ser bem controlados durante o cultivo

*in vitro*, tentando sempre seguir as características mais próximas possíveis do ambiente folicular *in vivo*.

O meio mais utilizado na MIV de oócitos bovinos é o tissue culture medium 199 (TCM-199), existindo poucos relatos que sugerem que outro meio possa ser mais apropriado (Gordon, 1994). Esse meio é constituído por uma fórmula complexa, originalmente designada para as necessidades metabólicas de célula somáticas, particularmente de linhagens celulares. Desta forma, esse meio não é específico para suprir as necessidades complexas e dinâmicas de COCs durante o cultivo de maturação. Esta é uma das principais deficiências na tecnologia da MIV de oócitos, o que leva muitos pesquisadores a realizarem extensas investigações na formulação de meios específicos para tal finalidade, bem como a inclusão de aditivos e suplementos para melhoria do meio e, conseqüentemente, da qualidade dos oócitos cultivados em sistemas *in vitro*.

As fontes proteicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para PIV bovinos são o soro e a albumina sérica bovina (Mingoti et al., 2002). No entanto, vários estudos demonstraram a desvantagem da utilização de fontes de origem animal nos meios de PIV, pois esses podem ser veículos para agentes infecciosos e tóxicos para o embrião (Gardner, 1994; Thompson et al., 1995). Ainda entre outras desvantagens, observa-se que geralmente embriões cultivados com soro ou BSA acumulam lipídeos, o que aumenta a sensibilidade à criopreservação (Abe et al., 2002; Gómez et al., 2008). Devido a esses fatores, muitos estudos indicam a utilização de meios quimicamente definidos, os quais não têm as desvantagens do soro, mas infelizmente produzem baixas taxas de blastocistos viáveis (McCaffery et al., 2000; Thomas et al., 2001; Ali e Sirard, 2002; Itoh et al., 2002; Thomas et al., 2003; Korkone et al., 2008).

Os hormônios LH e FSH adicionados no meio de maturação promovem uma melhora na expansão das células do cumulus oophorus (Younis e Brackett, 1992). O FSH estimula a produção de substâncias sinalizadoras pelas células somáticas, que induzem à retomada da meiose, estimulam a expansão do cumulus e, portanto, facilitam a fertilização.

O pH das soluções e do fluido celular é crítico para a eficiência de muitos eventos e reações bioquímicas que envolvem o equilíbrio ácido-básico e, devido a isto, influencia a produção de blastocistos. O uso de sistemas tampões em meio de cultivo é necessário para minimizar possíveis variações do pH do meio, que deve permanecer entre 7,3 e 7,5 durante a maturação de oócitos e o cultivo embrionário. Variações de pH no meio de cultivo, dependendo da amplitude, podem resultar em diminuição dos índices de fecundação e produção de blastocistos, já que a viabilidade celular é afetada. O sistema tampão empregado na MIV irá depender de o meio ser exposto ao ar atmosférico ou a uma atmosfera controlada. Geralmente a maturação *in vitro* é realizada em 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico, utilizando-se meio tamponado com bicarbonato de sódio para manutenção do pH em 7,4 sob essas condições. Por outro lado, quando oócitos ou embriões são manipulados em ar atmosférico, a utilização do HEPES N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid) mantém o pH de maneira eficiente e mais constante do que a utilização única de bicarbonato. O HEPES foi desenvolvido por Good et al. (1966). Trata-se de um tampão orgânico para pesquisas biológicas. Por ter máxima solubilidade em água, apresentar dificuldade para passar para a membrana celular, não formar complexos com substâncias biológicas, possuir baixa toxicidade, ser estável e não agir como inibidor em reações bioquímicas, é o sistema tampão orgânico mais utilizado para o cultivo de tecidos e células animais.

Quando utilizado por curto período de tempo, o HEPES pode ser vantajoso, especialmente quando se trabalha com oócitos e embriões expostos ao ar atmosférico. Seu uso é particularmente vantajoso em algumas situações, como, por exemplo, na exploração comercial da PIV onde os oócitos são obtidos por punção folicular guiada por ultrassom em animais vivos (OPU). Nesse procedimento, muitas vezes os oócitos são aspirados em locais distantes dos laboratórios de PIV e, nesses casos, o transporte dos oócitos é realizado em incubadora portátil em atmosfera ambiente (sem controle de CO<sub>2</sub>) a 38,5°C. Por outro lado, estudos recentes mostram que o HEPES pode diminuir o pH intracelular ou levar a uma diferença de incorporação de substratos carbono no RNA e/ou DNA e, assim, pode causar uma alteração no desenvolvimento da competência dos oócitos preservados (Hashimoto et al., 2003). Sabe-se ainda que o HEPES pode ser tóxico e causar fragmentação de células nas primeiras divisões do embrião, por isso muitos meios livres de HEPES são usados para manipulação de oócitos e embriões em ar atmosférico, preferindo-se o uso de bicarbonato (Iwasaki et al., 1999; Morgia et al., 2006).

Por fim, vários estudos têm indicado a suplementação do meio de MIV com fatores de crescimento recentemente estudados, como fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), Kit ligando (KL), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), dentre outros. Cada um desses fatores está ligado ao crescimento celular, ao desenvolvimento de mensageiros bioquímicos e aos receptores que se completam para a aquisição da competência final do oócito e, finalmente, para a melhora da PIV de embriões.

### **Inibidores da maturação *in vitro* de oócitos**

*In vivo*, oócitos passam por várias modificações moleculares e estruturais (capacitação) antes de completar a maturação. *In vitro*, a retomada da meiose ocorre repentina e espontaneamente, independente da competência adquirida. Assim, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena capacitação (Adona e Leal, 2006; Gilchrist e Thompson, 2007).

A maturação nuclear espontânea que ocorre em oócitos cultivados *in vitro* pode ser prevenida tentando-se manter o oócito em meiose estacionária. Dessa maneira, pode-se permitir que o desenvolvimento do ooplasma (maturação citoplasmática) e a aquisição da capacitação ocorram de maneira mais semelhante àquela observada *in vivo* (Gilchrist e Thompson, 2007). Além disso, o bloqueio da meiose é uma importante ferramenta para que se possam estudar os possíveis fatores envolvidos na indução da “capacitação” após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, já que a maturação nuclear do oócito não é suficiente para resultar no subsequente desenvolvimento embrionário. Todavia, convém ressaltar que, nesse tipo de estudo, é importante verificar não só a efetividade das substâncias em inibir o reinício da meiose, mas também sua eficiência na reversibilidade e na ausência de efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário.

O bloqueio da meiose pode ser obtido com o uso de estabilização farmacológica ou com inibidores fisiológicos (células da teca; Kubelka et al., 2000; Mermillod et al., 2000). Os diferentes tipos de inibidores farmacológicos atuam de modos distintos: podem manter altas concentrações de AMPc no interior do oócito, como a 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Bilodeau-Goeseels, 2003); podem inibir a síntese proteica de maneira não específica, como a cicloheximidine (Meinecke et al., 2001); podem inibir proteínas cinases, como a dimethylaminopurine (6-DMAP; Anderiesz et al., 2000; Dode e Adona, 2001); e, ainda, podem inibir especificamente a fosforilação de proteínas CDKs, como a roscovitina e a butirolactona I (Adona e Leal, 2004; Barreto et al., 2007).

Dentre todas as drogas que podem ser utilizadas para o bloqueio da meiose, a butirolactona I demonstrou ser a mais segura e eficiente. Butirolactona I é um inibidor natural isolado do fungo *Aspergillus terreus*, que exibe atividade antiproliferativa, inibindo seletivamente em mamíferos as cinases CDK2 e CDK1, que executam um importante papel na progressão do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M, respectivamente (Schimmel et al., 1998; Schang, 2004). Entretanto, tem pouco efeito nas proteínas cinases ativadas por mitógenos, proteína cinase C, cinases dependentes de AMPc, caseína cinase I e II e no receptor tirosina cinase do fator de crescimento epidermal (Schimmel et al., 1998; Sax et al., 2002; Braña et al., 2004). Recentemente, Kubelka et al. (2000) demonstraram que a butirolactona I na concentração de 100  $\mu$ M pode manter a meiose estacionada em bovinos por 24 a 28 horas. Todavia, recentes estudos demonstraram que oócitos bovinos podem ter a meiose bloqueada de forma eficaz e reversível utilizando-se baixas concentrações de butirolactona I (10  $\mu$ M), desde que seja utilizada em meio sem macromoléculas (Adona e Leal, 2006).

### Considerações finais e perspectivas futuras

A maturação do oócito envolve muitos mecanismos complexos, muitos dos quais não estão totalmente compreendidos. Devido a esse fato, a maturação *in vitro* ainda não é totalmente eficiente a ponto de proporcionar um grande número de oócitos competentes que suportem o desenvolvimento de um embrião viável. Assim, torna-se necessário focar a atenção nos diversos fatores de crescimento que são secretados pelo oócito, cujas funções são de controlar aspectos fundamentais das atividades das células do cumulus, e vice-versa. A interação e a regulação recíproca entre oócito e células foliculares são responsáveis pela criação de um microambiente único, capaz de oferecer todas as condições para a aquisição da competência e capacitação do oócito. O avanço desses estudos poderá elucidar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de maturação, os quais poderão contribuir para tornar o sistema de produção *in vitro* de embriões mais eficiente.

### Agradecimentos

Apoio financeiro: FAPESP.

### Referências bibliográficas

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.57-66, 2002.
- Abrieu A, Dorée M, Fisher D.** The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci*, v.114, p.257-267, 2001.
- Abbott AL, Ducibella T.** Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci*, v.6, p.792-806, 2001.
- Adona PR, Leal CLV.** Effect of concentration and exposure period to butirolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.58, p.354-359, 2006.
- Adona PR, Leal CLV.** Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote*, v.12, p.197-204, 2004.
- Adona PR, Pires PR, Quetglas MD, Schwarz KR, Leal CL.** Prematuration of bovine oocytes with butirolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development.

*Anim Reprod Sci*, v.108, p.49-56, 2008.

**Ali A, Sirard MA.** Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, v. 66, p.901-905, 2002.

**Anderiesz C, Fong CY, Bongso A, Trounson AO.** Regulation of human and mouse oocyte maturation *in vitro* with 6-dimethylaminopurine. *Hum Reprod*, v.15, p.379-388, 2000.

**Arris CE, Boyle FT, Calvert AH, Curtin NJ, Endicott JA, Garman EF, Gibson AE, Golding BT, Grant S, Griffin RJ, Jewsbury P, Johnson LN, Lawrie AM, Newell DR, Noble Mem, Edward A, Sausville EA, Schultz R, Yu W.** Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles. *J Med Chem*, v.43, p.2797-2804, 2000

**Barretto, LSS, Caiado Castro VSD, Garcia JM, Mingoti GZ.** Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.202-207, 2007

**Bilodeau-Goeseels S.** Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology* v.60, p.1679-1690, 2003.

**Braña MF, García ML, López B, De Pascual, Teresa B, Ramos A, Pozuelo JM, Domínguez MT.** Synthesis and biological evaluation of analogues of butyrolactone I and molecular model of its interaction with CDK2. *Org Biomol Chem*, v.2, p.18641871, 2004.

**Brevini TAL, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F.** Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.23-38, 2007.

**Can A, Semiz O, Çınar O.** Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod*, v.9, p.749-756, 2003.

**Conti M, Andersen CB, Richard FJ, ShitsukaWa K, Tsafiri A.** Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Mol Cell Endocrinol*, v.145, p.9-14, 1998.

**Cohen RS.** Oocyte patterning: dynein and kinesin, inc. *Curr Biol*, v.12, p.797-799, 2002.

**Cummins JM.** The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Domest Anim*, v.115, p.S23-S29, 2004.

**De La Fuente R, Eppig JJ.** Transcriptional Activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol*, v.229, p.224-236, 2001.

**De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME, Watson AJ.** Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology*, v. 49, p.115-128, 1998.

**De Sousa PA, Silva SJM, Anderson RA.** Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.375-385, 2004.

**Dekel N.** Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*, v.234, p.19-25, 2005.

**Dode MA, Adona PR.** Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.171-180, 2001.

**Dumont J, Umbhauer M, Rassinier P, Hanauer A, Verlhac MH.** p90Rsk is not involved in cytoskeletal factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol*, v.169, p.227-231, 2005.

**Edwards RG.** Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, v.208, p.349-51, 1965.

**Eppig J, O'Brien M, Wigglesworth K.** Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v.44, p.260-273, 1996.

**Eyers PA, Liu J, Hayashi NR, Lewellyn AL, Gautier J, Maller JL.** Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, v.280, p.24339-24346, 2005.

**Fair T.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.203-216, 2003.

**Gandolfi BTAL, Gandolfi F.** The maternal legacy to the embryo: 59 cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255-1276, 2001.

**Gardner DK.** Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol*, v.18, p.1163-1179, 1994.

**Gilchrist RB, Thompson JG.** Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, v.67, p.6-15, 2007.

**Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Morán E, Facal N, Díez C.** Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, v.69, p.1013-1021, 2008.

**Gordon I.** *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford, UK: CABI International, 1994, 640p.

**Gottardi FP.** *Inibição da maturação nuclear pela Butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados à produção in vitro de embriões (PIV)*. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

**Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H.** Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol Reprod*, v.66, p.1696-1701, 2003.

**Horne MM, Guadagno TM.** A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic

spindle. *J. Cell Biol*, v.161, p.1021-1028, 2003.

**Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.

**Inoue M, Naito K, Nakayama T, Sato E.** Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biol Reprod*, v.58, p.130-136, 1998.

**Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H.** Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod*, v.67, p.1099-1105, 2002.

**Iwasaki T, Kimura E, Totsukawa K.** Studies on a chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology*, v.51, p.709-720, 1999.

**Jones KT.** Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod*, v.10, p.1-5, 2004.

**Kano F, Takenaka K, Yamamoto A, Nagayama K, Nishida E, Murata M.** MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic *xenopus* extracts. *J Cell Biol*, v.149, p.357-368, 2000.

**Khatir H, Lonergan P, Mermillod P.** Kinetics of nuclear maturation and profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, v.50, p.917-929, 1998.

**Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko K, Yamashita M, Tojo H, Toyoda Y.** Inactivation of p34<sup>cdc2</sup> kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged *in vitro*. *Zygote*, v.7, p.173-179, 1999.

**Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko K, Yamashita M, Tojo H, Toyoda Y.** Maturation/M-phase promoting factor: A regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod*, v.63, p.715-722, 2000.

**Kim NH, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park S, Pill Lim JH.** The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. *Zygote*, v.8, p.25-32, 2000.

**Krischek C, Meinecke B.** *In vitro* maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. *Anim Reprod Sci*, v.73, p.129-140, 2002.

**Korkone K, Kananen K, Ketoja E, Matoma J, Halmekyto M, Peippo J.** Effects of serum-free *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.42-49, 2008.

**Kotsuji FH, Hkubo MH, Htominaga TH.** Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, v.100, p.151-156, 1994.

**Kubelka M, Motlik J, Schultz RM, Pavlok A.** Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod*, v.62, p.292-302, 2000.

**Ledan E, Polanski Z, Terret M-E, Maro B.** Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev Biol*, v.232, p.400-413, 2001.

**Lefebvre C, Terret ME, Djiane A, Rassinier P, Maro B, Verlhac M-H.** Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol*, v.157, p.603-613, 2002.

**Le Gal F, Gall L, De Smedt V.** Changes in protein synthesis patterns during *in vitro* maturation of goat oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.32, p.1-8, 1992.

**Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M, Fair T.** Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. *Mol Reprod Dev*, v.64, p.369-378, 2003.

**Lonergan P, Fair T.** *In vitro*-produced bovine embryos- Dealing with the warts. *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.

**Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P.** Bovine blastocyst production *in vitro* following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil*, v.109, p.355-365, 1997.

**Mapelli M, Massimiliano L, Rovace C, Seeliger MA, Tsai L-H, Meijer L, Musacchio A.** Mechanism of CDK5/p25 Binding by CDK Inhibitors. *J Med Chem*, v.48, p.671-679, 2005.

**Mayes M, Sirard MA.** The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, v.55, p.911-922, 2001.

**McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE.** Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod*, v.63, p.267-273, 2000.

**Meinecke B, Janas U, Podhajsky E, Meinecke-Tillmann S.** Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.183-188, 2001.

**Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L.** High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.89-95, 2000.

**Mingoti, GZ, Garcia JM, Rosa e Silva AAM.** Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. *Anim Reprod Sci*, v.69, p.175-186, 2002.

- Mingoti, GZ, Garcia JM, Rosa e Silva AAM. The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz J Med Biol Res*, v.2, p.213-217, 1995.
- Morgia FM, Torti M, Montigiani M, Piscitelli C, Giallonardo M, Schimberni M, Giannini P, Sbracia M. Use of a medium buffered with N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate (HEPES) in intracytoplasmic sperm injection procedures is detrimental to the outcome of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, v.85, p.1415-1419, 2006.
- Motlik, J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocyte. *Theriogenology*, v.49, p.461-469, 1998.
- Nebreda AR, Ferby I. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol*, v.12, p.666-675, 2000.
- Park Y-S, Kim S-S, Kim J-M, Park H-D, Byun M-D. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*, v.64, p.123-134, 2005.
- Pincus G, Enzmann E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med*, v.62, p.665-675, 1935.
- Reynier P, May-Panloup P, Chrétien M-F, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barrière P, Malthiery Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 7:425-429, 2001.
- Rodriguez KF, Farin CE. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.55-67, 2004.
- Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol*, v.68, p.320-344, 2004.
- Sax JK, Dash BC, Hong R, Dicker DT, El-Deiry WS. The Cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone is a potent inhibitor of p21WAF1/CIP1 expression. *Cell Cycle*, v.1, p.90-96, 2002.
- Schang LM. Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. *Biochim Biophys Acta*, v.1697, p.197-209, 2004.
- Schimmel TG, Coffman AD, Parsons SJ. Effect of butyrolactone i on the producing fungus, aspergillus terreus. *Appl Environ Microbiol*, v.64, p.3707-3712, 1998.
- Schroeter D, Meinecke B. Comparative analysis of the polypeptide pattern of cumulus cells during maturation of porcine cumulus oocyte complexes *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Nutr Dev*, v.35, p.85-94, 1995.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.
- Sirard MA, Richard F, Mayes M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, v.49, p.483-497, 1998.
- Steuerwald N, Barritt JA, Adler R, Malter H, Schimmel T, Cohen J, Brenner CA. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. *Zygote*, v.9, p.209-215, 2000.
- Stojkovic M, Machado SA, Sotojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod*, v.64, p.904-909, 2001.
- Sun QY. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech*, v.61, p.342-348, 2003.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheon GHT, Day BN, Prather RS, Schatten, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*, v.122, p.155-163, 2001.
- Sun XF, Wang WH, Keefe DL. Overheating is detrimental to meiotic spindles within *in vitro* matured human oocytes. *Zygote*, v.12, p.65-70, 2004.
- Tarazona AM, Rodríguez Olivera-Angel M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.5-11, 2006.
- Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*, v.122, p.487-495, 2001.
- Thomas HF, Walters AK, Telfer EE. How to make a good oocyte: an update on *in-vitro* models to study follicle regulation. *Hum Reprod Update*, v.9, p.541-555, 2003.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod*, v.53, p.1385-1391, 1995.
- Tong C, Fan HY, Chen DY, Song XF, Schatten H, Sun QY. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Res*, v.13, p.375-383, 2003.
- Tribaut C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent process? *J Reprod Fertil*, v.51, p.1-15, 1997.

- Van Blerkom J, Davis P, Lee J.** ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*, v.10, p.415-424, 1995.
- Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S.** Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod*, v.17, p.393-406, 2002.
- Velilla E, Izquierdo D, Ridriguez-Gonzales E, Lopes-Bejar M, Vidal F, Paramio MT.** Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and cytochemical study. *Mol Reprod Dev*, v.68, p.507-514, 2004.
- Wang W, Day BN, Wu G.** How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc Res Tech*, v.61, p.335-341, 2003.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P.** Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, v.57, p.2105-2117, 2002.
- Wassarman PM, Albertini DF.** Cytochalasin b-induced pseudocleavage of mouse oocytes *in vitro*: asymmetric localization of mitochondria and microvilli associated with a stage-specific response. *J Cell Sci*, v.21, p.523-535, 1994.
- Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S.** The biology of Cortical Granules. *Int Rev Cytol*, v.209, p.117-206, 2001.
- Wilding M, Dale B, Marino M, Di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G.** Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*, v.16, p.909-917, 2001.
- Wilding M, De Placido G, De Matteo L.** Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertil Steril*, v.79, p.340-436, 2003.
- Wu B, Ignatz GG, Currie WB, Yang X.** Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and *cumulus* cells during maturation *in vitro* of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.45, p.560-565, 1996.
- Xu KP, Bracket BG.** A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fertil*, v.82, p.127-134, 1988.
- Xu X, Zhang X, Li X, Cheng H, Kuai Y, Wang S, Guo Y.** Translocation of classical PKC and cortical granule exocytosis of human oocyte in germinal vesicle and metaphase II stage. *Acta Pharmacol Sin*, v.27, p.1353-1358, 2006.
- Younis A.I., Brackett B.G.** Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v.2, p.44-51, 1992.