

## ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Letícia Ferrari Crocomo<sup>1\*</sup>  
Wolff Camargo Marques Filho<sup>2</sup>  
Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga<sup>3\*</sup>  
Sony Dimas Bicudo<sup>3\*</sup>

### RESUMO

A maturação oocitária consiste numa etapa crucial e limitante para a produção de embriões *in vitro*, uma vez que o potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário está diretamente relacionado à adequada maturação citoplasmática e nuclear. O bloqueio, reinício e progressão das divisões meióticas assim como as modificações moleculares e estruturais são fundamentais para que o oócito possa finalizar o processo de maturação, sofrer a fertilização, e sustentar os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário. Estes eventos envolvem uma complexa interação entre segundo mensageiros, proteínas quinases e fosfatases, que ainda não está totalmente esclarecida. A maturação oocitária *in vitro*, no entanto, difere em determinados aspectos do observado *in vivo*. Deste modo, o esclarecimento dos mecanismos de ação das diversas moléculas envolvidas na regulação do processo de maturação oocitária é fundamental para o progresso científico e biotecnológico.

**Palavras-chave:** oócito, maturação, meiose, *in vivo*, *in vitro*

### BIOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF OOCYTE MATURATION

#### ABSTRACT

The oocyte maturation is a crucial and limiting step for the *in vitro* embryo production, since the development potential of oocytes and embryos is directly related to proper nuclear and cytoplasmic maturation. The arrest, resumption and progression of meiotic divisions as well as molecular and structural changes are fundamental for the oocyte to complete the processes of maturation and fertilization, and sustain the early stages of embryonic development. These events involve a complex interaction between second messengers, protein kinases and phosphatases, which have not yet been fully clarified. The oocyte maturation *in vitro*, however, differs in certain aspects from that observed *in vivo*. So, the elucidation of the action mechanisms of several molecules involved in regulating oocyte maturation process is essential to scientific and biotechnological progress.

**Key-words:** oocyte, maturation, meiosis, *in vivo*, *in vitro*

<sup>1\*</sup> Médica Veterinária doutoranda em Reprodução Animal, bolsista FAPESP, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Ifcrocomo@hotmail.com.

<sup>2</sup> Pós-graduando da FMVZ-UNESP Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Prof. Dr. do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo. Correspondência: Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP 18618-000 Botucatu – SP

## ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DE LA MADURACIÓN DE LOS OVÓCITOS

### RESUMEN

La maduración de los ovocitos es un paso crucial y limitante para la producción de embriones *in vitro*, siendo que el potencial de desarrollo de los ovocitos y embriones está directamente relacionada con la adecuada maduración nuclear y citoplasmática. El bloqueo, el reinicio y la progresión de las divisiones meióticas así como los cambios moleculares y estructurales son fundamentales para el ovocito completar el proceso de maduración, sufrir la fertilización, y mantener las primeras etapas del desarrollo embrionario. Estos eventos implican una compleja interacción entre los segundos mensajeros, las proteínas quinasas y fosfatasa, que aún no han sido totalmente aclarado. La maduración de los ovocitos *in vitro*, sin embargo, difiere en ciertos aspectos de lo observado *in vivo*. Por lo tanto, la elucidación de los mecanismos de acción de varias moléculas que participan en la regulación del proceso de maduración de los ovocitos es esencial para el progreso de la ciencia y de la biotecnología

**Palavras-clave:** ovocito, maduración, meiosis, *in vivo*, *in vitro*

### INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) permite a utilização de uma mesma doadora de oócitos desde a pré-puberdade até a senilidade, e nas primeiras horas *post-mortem*. Esta biotecnologia também visa à recuperação de oócitos de animais com distúrbios reprodutivos não transmissíveis geneticamente e a estocagem de oócitos em bancos de germoplasma. Além disso, consiste numa importante ferramenta para pesquisa relacionada à transgenia e clonagem, e para o esclarecimento dos processos fisiológicos que ocorrem *in vivo* e aprimoramento da técnica *in vitro* (1, 2).

A maturação oocitária *in vitro* (MIV) é uma etapa crucial e limitante para o sucesso da PIV em algumas espécies. A simples remoção dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) do ambiente folicular culmina em reinício meiótico espontâneo independente da maturidade citoplasmática, o que resulta em menores taxas de desenvolvimento embrionario *in vitro* (3). Além disso, o sucesso da MIV depende diretamente da qualidade oocitária e da eficiência do método de recuperação dos COCs de doadoras ou de ovários oriundos de matadouro, além dos componentes do meio de maturação e das condições de cultivo (4).

A compreensão dos complexos mecanismos envolvidos na regulação da maturação oocitária é essencial para identificação de estratégias que permitam melhorar os índices de produção de embriões *in vitro*. Baseado no exposto, esta revisão se propõe a abordar alguns dos inúmeros aspectos endócrinos, celulares e bioquímicos envolvidos no processo da maturação oocitária *in vivo* e *in vitro*.

### MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Na maioria dos mamíferos, durante a vida intra-uterina os oócitos iniciam a meiose após intensas mitoses. Diversos fatores inibitórios sintetizados pelas células da granulosa e presentes no fluido folicular interrompem as divisões meióticas no estágio diplóteno da prófase I, morfologicamente designado como vesícula germinativa (VG) (5,6). Neste estágio, os oócitos permanecem até a puberdade, quando passam a ser gradualmente mobilizados, havendo retomada da meiose, sob estímulo gonadotrófico, próximo à ovulação (6). Durante o

bloqueio meiótico, ocorrem modificações que incluem a síntese protéica, transcrição de mRNA e a reorganização de organelas que conferem ao oócito capacidade para sustentar as etapas posteriores do desenvolvimento (7).

Portanto, a maturação oocitária envolve duas etapas principais: a maturação nuclear, que se inicia com a quebra de vesícula germinativa (GVBD) e termina apenas quando a meiose é finalizada, marcada pela segregação dos cromossomos e extrusão dos dois corpúsculos polares, e a maturação citoplasmática, que envolve modificações citoesqueléticas e moleculares nos oócitos (8). Apesar de independentes, as maturações nuclear e citoplasmática interagem e, *in vivo*, ocorrem simultaneamente em determinados momentos, garantindo a plena capacitação do oócito (9, 10). A regulação da maturação oocitária envolve uma sequência de eventos que ainda não está completamente esclarecida, e se caracteriza pela fosforilação, desfosforilação e atividade de diversas moléculas (11).

## MATURAÇÃO NUCLEAR

De acordo com Silva (12), a maturação nuclear ou meiótica corresponde à divisão reducional dos cromossomos, que tem como objetivo central a produção dos gametas haplóides, aptos para fecundação e posterior desenvolvimento embrionário.

## REINÍCIO DA MATURAÇÃO NUCLEAR IN VIVO

De acordo com Richard e Sirard (13), o reinício da maturação meiótica é desencadeado primariamente pela onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH). Essa gonadotrofina, no entanto, não atua diretamente no oócito, uma vez que este não apresenta receptores para LH. Sua ação é mediada por fatores parácrinos secretados pelas células somáticas LH-responsivas (células da granulosa), e pelo transporte de substâncias indutoras da meiose das células da granulosa/*cumulus* para os oócitos por meio das junções “Gap” comunicantes (GJCs) (14).

A regulação gonadotrófica da GVBD também é atribuída à interrupção da transferência de fatores inibidores da maturação ao oócito, decorrente da expansão das células do *cumulus* com conseqüente perda da comunicação intercelular entre os COCs e as células da granulosa murais do folículo, designadas células foliculares (15).

A oscilação da concentração de segundos mensageiros, no oócito e nas células do *cumulus*, e ativação da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e do fator promotor da maturação (MPF) também desempenham importante função neste processo de bloqueio e reinício meiótico (16).

## REINÍCIO DA MATURAÇÃO NUCLEAR IN VITRO

Segundo Byskov et al. (17), com a remoção do ambiente folicular, o COC perde seu contato com as células foliculares e como conseqüência da interrupção da transferência de fatores inibidores da GVBD ao oócito, ocorre retomada “espontânea” da meiose independente do estadio de maturidade citoplasmática.

Além disso, COCs recuperados de pequenos folículos antrais ainda não completaram o desenvolvimento molecular e celular necessários para suportar a maturação e a fase inicial da embriogênese (18). Deste modo, passa a existir uma assincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática, resultando em menores taxa de desenvolvimento embrionário (3).

A retomada da maturação meiótica, *in vivo* e *in vitro*, é caracterizada pela GVBD, estadio no qual ocorre dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina.

Posteriormente, o oócito passa pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica, com formação do primeiro corpúsculo polar (19). Em seguida, há progressão ao estádio de MII, caracterizado pela presença dos cromossomos arranjados no centro do fuso e um corpúsculo polar no espaço perivitelínico. Esta habilidade em reiniciar e completar a meiose é adquirida gradualmente durante a foliculogênese (12).

Os mecanismos envolvidos no bloqueio e reinício das divisões meióticas ainda não estão totalmente esclarecidos, mas estudos indicam que são modulados por diversas substâncias (8). É importante salientar que os processos celular e molecular da maturação oocitária *in vivo* e *in vitro* são diferentes em determinados aspectos, uma vez que, *in vivo* há ação gonadotrófica sobre as células da granulosa e indução da expressão de fatores indutores da maturação nuclear, o que não ocorre *in vitro* (20).

## MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

Os complexos eventos que ocorrem durante a maturação oocitária não envolvem somente a correta dinâmica de separação cromossômica durante a maturação nuclear, mas também a redistribuição das organelas citoplasmáticas, e o estoque de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro), energia, proteínas e outros fatores necessários para o processo de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (21).

A capacidade do oócito em bloquear a poliespermia, promover a descondensação do espermatozóide já no interior do ooplasma, formar o pronúcleo após a fertilização, e sustentar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário, depende da adequada maturação citoplasmática (6, 10). Esse processo inclui modificações estruturais no oócito, caracterizadas pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, dinâmica dos filamentos do citoesqueleto, e maturação molecular (12).

## MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NO OÓCITO

Em síntese, ao longo da foliculo-oogênese até próximo a retomada da maturação nuclear ocorre: formação das GJCs entre o oócito e suas células somáticas circundantes; desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito; secreção dos grânulos corticais (CG) e das proteínas da zona pelúcida pelo Complexo de Golgi; desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e formação das gotas lipídicas; diferenciação e aumento da quantidade de mitocôndrias; formação e estoque de ribossomos; além da transcrição de mRNA e síntese de proteínas que são fundamentais para progressão da maturação de desenvolvimento embrionário inicial (22).

Com a retomada da maturação nuclear, a maioria das organelas migra para o centro da célula. No oócito imaturo, as mitocôndrias e o complexo de Golgi se localizam periféricamente. Ao longo da progressão meiótica, as mitocôndrias assumem posição mais central no ooplasma e passam a se associar às gotículas de lipídeo (21). O complexo de Golgi diminui o seu desenvolvimento e praticamente desaparece (12). O retículo endoplasmático, que durante o estádio de GV se encontra distribuído uniformemente no ooplasma, se desloca para região cortical do ooplasma (9).

Os grânulos corticais merecem especial atenção uma vez que sua migração no ooplasma é fundamental para adequada maturação citoplasmática, sendo utilizada como critério de avaliação desta (23). Estes grânulos são organelas derivadas do complexo de Golgi, compostas por grande diversidade de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos (9).

Nos oócitos no estágio de GV, os grânulos corticais estão distribuídos, em grumos, por todo ooplasma. Conforme a maturação meiótica progride, há migração em direção ao córtex do oócito. No final do período de maturação, quando os oócitos alcançam o estágio de MII, os CGs se encontram próximo à superfície interna da membrana plasmática, formando uma monocamada estratégica para aguardar a penetração do espermatozóide (24).

Com a fertilização e em resposta à elevação da concentração do cálcio intraocitário, os CGs se fundem à membrana plasmática e liberam seu conteúdo no espaço perivitelínico (25). Este evento, conhecido como reação cortical, é um dos mecanismos para impedir a poliespermia, que resultaria em clivagem anormal do zigoto e degeneração embrionária (9).

Segundo Thibault et al. (24), os microfilamentos estão implicados no descolamento dessas organelas no ooplasma. Além disso, também ocorrem expansão das células do *cumulus* e mudanças morfológicas nas GJs (26).

## MATURAÇÃO MOLECULAR

Segundo Sirard et al. (27), a maturação molecular envolve a transcrição, estoque e processamento de mRNAs que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos. Estas proteínas estão envolvidas no processo de maturação e nos eventos celulares subsequentes, tais como fertilização, formação dos pronúcleos e fase inicial da embriogênese (12).

A transcrição e estoque de mRNAs ocorre durante a folículo-oogênese, enquanto o núcleo celular se encontra em quiescência meiótica, e cessa quando ocorre a retomada da meiose, uma vez que os cromossomos se tornam condensados e “inativos”. Em contrapartida, a capacidade de tradução do mRNA e síntese proteica se mantém ao longo de todo desenvolvimento oocitário e embrionário (28).

A maior parte do mRNA persiste no ooplasma em sua forma estável, porém inativa caracterizada pela presença da cauda poli-A curta (28). Sob sinais específicos gerados durante a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, ocorre a poliadenilação, ou seja, a adição de adeninas à porção terminal 3' do mRNA, por ação da enzima poli-a polimerase, com consequente liberação de moléculas repressoras acopladas à porção 5', permitindo o início da tradução do mRNA e síntese proteica (29,30).

Deste modo, a eficiência do armazenamento e reativação oportuna dos mRNAs, regulados pelo processo de poliadenilação, determina a competência do oócito para suportar os posteriores estádios do desenvolvimento (21).

## MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO BLOQUEIO E REINÍCIO MEIÓTICO

Os complexos mecanismos envolvidos na regulação da maturação oocitária não estão totalmente elucidados, mas se reconhece a importância do estímulo hormonal desencadeante da maturação meiótica *in vivo*, e de determinadas moléculas como RAS, RAF, MOS, MEK, MAPK, MPF, cAMP, entre outras. Segundo Wehrend e Meinecke (31), a retomada da meiose e o processo de maturação são regulados pela fosforilação e desfosforilação proteica, mediadas pelas proteínas quinases e fosfatases, respectivamente. Vale ressaltar ainda que a maior parte do conhecimento referente à regulação da maturação oocitária foi obtida a partir de estudos com sapos *Xenopus laevis* e camundongos.

## ADENOSINA 3'-5' MONOFOSFATO CÍCLICO (CAMP)

O bloqueio prolongado dos oócitos no estágio de prófase I e a subsequente retomada da meiose estão correlacionados com mudanças na concentração intraocitária de cAMP (32). No entanto, esta não é a única molécula envolvida nestes processos.

A cAMP ou adenosina 3'-5' monofosfato cíclico é um segundo mensageiro celular derivado da adenosina trifosfato (ATP) pela ação da enzima adenilato ciclase (AC), que está localizada nas membranas celulares e pode ser ativada ou inibida por meio das proteínas G. Estas correspondem a um conjunto de proteínas acopladas aos receptores da membrana celular e envolvidas na cascata de segundos mensageiros, que respondem ao estímulo hormonal ou à qualquer outro estímulo (33). De acordo com Dekel et al. (15), a cAMP pode ser produzida endogenamente nos oócitos ou, à eles transferida pelas células do *cumulus* pelas GJCs.

A ativação da enzima adenilato ciclase promove aumento na concentração intracelular de cAMP, que interage e regula outras proteínas, como a proteína quinase A (PKA) também designada proteína quinase A dependente de cAMP (34). Na ausência da cAMP, a PKA se mantém como tetrâmero inativo (R2C2) composto por um dímero de subunidades reguladoras (RI e RII), com alta afinidade ao cAMP, vinculadas a 2 subunidades catalíticas (C). A ligação do cAMP às subunidades reguladoras, induz mudanças conformacionais, que permitem a liberação dos 2 monômeros ativos C que promovem a fosforilação e desfosforilação de proteínas específicas envolvidas no bloqueio e reinício meiótico (35).

As PKAs podem ser classificadas ainda em tipo I e II, de acordo com o predomínio das subunidades reguladoras, sendo que as PKAs tipo I se localizam nos oócitos e estão relacionadas à manutenção do bloqueio meiótico. Já as PKAs tipo II foram detectadas nas células do *cumulus* e estão relacionadas ao reinício meiótico e expansão das células do *cumulus* (34).

A cAMP tem uma meia-vida muito curta, sendo degradada no interior das células onde se formou, pela ação das fosfodiesterases (PDE). Segundo Tsafiriri et al. (36), existem dois subtipos de fosfodiesterases, sendo o subtipo 3 presente nos oócitos e o subtipo 4 nas células foliculares. A regulação seletiva destas fosfodiesterases pelo estímulo gonadotrófico determina o reinício meiótico e, em poucos minutos, a concentração de cAMP retorna ao nível basal. A atividade destas PDEs, no entanto, pode ser inibida por derivados de purinas, como as hipoxantinas presentes no fluido folicular, resultando em acúmulo de cAMP intraocitário e conseqüente manutenção do oócito em estadio de GV (23).

Estudos sugerem que as gonadotrofinas promovem elevação da concentração de cAMP com conseqüente ativação da PKAII, resultando na expressão de substâncias indutoras da GVBD e na expansão do *cumulus* (37). Segundo Deckel et al. (15), a perda da comunicação entre os COCs e as células foliculares, decorrente do estímulo hormonal ou da remoção dos COCs do ambiente folicular, interrompe a transferência de moléculas inibitórias e cAMP para os oócitos, resultando na redução da concentração intraocitária de cAMP e decréscimo da atividade da PKAI, com conseqüente retomada das divisões meióticas.

Downs e Dunn (34) acreditam, no entanto, que a magnitude da oscilação da concentração de cAMP, no oócito e células do *cumulus*, determina a progressão da maturação oocitária, e não necessariamente o nível absoluto de cAMP no interior destes tipos celulares.

## PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITÓGENOS (MAPK)

As MAPKs pertencem à família das proteínas kinases serina-treonina e também são conhecidas como quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), uma vez que são ativadas por sinais extracelulares e os transmitem para o interior da célula (38). Estas proteínas estão envolvidas no reinício e progressão da maturação nuclear, na reorganização dos microtúbulos e formação do fuso meiótico, na manutenção do oócito em estadio de MII, e na expansão das células *cumulus* (37).

A MAPK está presente tanto no oócito, no qual é ativada pela proteína quinase *MOS*, quanto nas células do *cumulus*, nas quais é ativada pelas quinases *RAS/RAF*. Em ambas as

células, a MAPK é ativada pela fosforilação dos resíduos de tirosina e treonina pela MEK, também designada MAPKK (proteína quinase ativadora da MAPK). Esta MEK também é ativada pela fosforilação mediada, no entanto, pelas proteínas *MOS* no oócito, e *RAS/RAF* nas células do *cumulus* (12).

Segundo Sagata (39), quando ativada, a MAPK promove a ativação e estabilização do fator promotor da maturação (MPF) nos oócitos, pela inibição de alguns reguladores negativos deste fator e da ativação da enzima *cdc25* fosfatase. Em oócitos de bovinos, a ativação da MAPK e do MPF ocorre praticamente ao mesmo tempo, pouco antes da GVBD, sendo que a atividade da MAPK aumenta gradualmente ao longo da maturação oocitária e se mantém alta até o estágio de MII (32). Níveis elevados de MAPK e MPF são necessários para manutenção dos oócitos no estágio de MII, sendo que a fertilização ou ativação partenogenética promove queda abrupta na concentração intraoocitária dessas duas quinases e conduz à conclusão da meiose (40).

De acordo com Fan e Sun (16), a ativação e inativação da MAPK também está relacionada à variação na concentração de cAMP e PKA, tanto no oócito quanto nas células do *cumulus*. Segundo Sun et al. (41), a ativação da MAPK nas células do *cumulus* também depende dos fatores parácrinos secretados pelo oócito, o que demonstra a capacidade do oócito em controlar sua própria maturação meiótica (10). Vale ressaltar ainda que, ao contrário do constatado *in vivo*, a retomada da maturação nuclear *in vitro* ocorre espontaneamente e independe da ativação desta proteína (12).

## FATOR PROMOTOR DA MATURAÇÃO (MPF)

Conforme descrito anteriormente, a maturação oocitária é regulada por complexos eventos que culminam com a ativação do fator promotor da maturação (MPF), conhecido como regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (42).

O MPF é um composto dimérico, que pertence à família das proteínas quinases, e é constituído por uma subunidade catalítica, a quinase dependente de ciclina denominada *cdk1* ou *p34<sup>cdc2</sup>*, que controla a divisão celular e uma subunidade reguladora, a ciclina B1 (20). A aquisição de competência meiótica está associada à ativação da *p34<sup>cdc2</sup>* no final do desenvolvimento oocitário (43) e à presença de quantidade adequada de ciclina B1 para ativação do pré-MPF.

Em sua forma inativa, pré-MPF, a subunidade catalítica se apresenta fosforilada nos resíduos Thr14 (treonina-14) e Tyr 15 (tirosina-15) (44). O MPF é ativado quando ocorre a desfosforilação destes resíduos, catalisada pela *cdc 25* fosfatase, e associação das duas subunidades, *p34cdc2* e ciclina B (18). Segundo Nebreda e Hunt (45), proteínas quinases como *MOS* e MAPK podem estar envolvidas na ativação da enzima *cdc25* fosfatase.

Estudos indicam que a elevada concentração de cAMP intraoocitária inibe a ativação do MPF, por prevenir a desfosforilação dos resíduos Thr14 e Tyr 15 e reprimir a síntese de ciclina B1, através da ativação da PKAI (46). Sob baixa concentração intraoocitária de cAMP e conseqüentemente de PKA, ocorre a ativação do MPF que promove a fosforilação das proteínas do envoltório nuclear, dissolução do nucléolo, condensação cromossômica e reorganização do citoesqueleto, ou seja, ocorre a GVBD e progressão da meiose até MII (47).

De acordo com Josefsberg et al. (46) a atividade do MPF apresenta padrão oscilatório ao longo da maturação oocitária. A ativação deste fator é necessária para o reinício da meiose e sua atividade elevada é requerida para progressão até o estágio de MI, no qual alcança nível máximo, sofrendo declínio antes da extrusão do primeiro corpúsculo polar e novo incremento antes de iniciar a meiose II. Apesar de já concretizada a idéia de que o MPF é fundamental na maturação nuclear oocitária, ainda não se conhece com exatidão os mecanismos responsáveis por sua ativação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de todo conhecimento referente à maturação oocitária e dos inúmeros estudos e recentes avanços na PIV, ainda existem muitas incógnitas a serem desvendadas e obstáculos a serem ultrapassados visando melhorar a eficiência desta biotecnologia que é uma importante ferramenta de melhoramento genético. Para isto, é necessária a consolidação do conhecimento obtido *in vivo* e estabelecimento da real função e mecanismo de ação das diversas moléculas envolvidas em todo processo desde a maturação oocitária até o desenvolvimento embrionário para que, posteriormente, este conhecimento seja direcionado à fiel reprodução *in vitro* de tais eventos.

## REFERÊNCIAS

1. Simplício AA, Freitas VJF, Fonseca JF. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. Rev Bras Reprod Anim. 2007;31:234-46.
2. Traldi AS. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: Anais do 3º Congresso Internacional Feinco; 2008, São Paulo. São Paulo: Feira Internacional Caprinos e Ovinos; 2008. p.1-11.
3. Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. Theriogenology. 1997;47:1061-75.
4. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Salahudin S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. Small Rumin Res. 2000; 36:63-7.
5. Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. Theriogenology. 1998;49:461-9.
6. Hurk VDR, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology. 2005;63:1717-51.
7. Bertagnolli AC, Gonçalves PBD, Giometti IC, Costa LFS, Oliveira JFC, Gonçalves IDV, et al. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004;56:488-96.
8. Tosti E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. Reprod Biol Endocrinol. 2006;4:26.
9. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology. 2008;71:836-48.
10. Yamada M, Isaji Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. Reprod Med Biol. 2011;10:69-79.

11. Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev.* 1996;8:485-9.
12. Silva IO. Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos cumulus oophorus bovinos cocultivados com hemiseções foliculares em meio de cultura definido [dissertação]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2008.
13. Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod.* 1996;54:22-8.
14. Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus–oocyte complex. *J Cell Biol.* 1978;78:58-75.
15. Dekel N, Lawrence TS, Gilula NB, Beers WH. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus–oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol.* 1981;86:356-62.
16. Fan HY, Sun QY. Minireview: involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod.* 2004; 70:535-47.
17. Byskov AG, Yding-Andersen C, Hossaini A, Guoliang X. Cumulus cells of oocyte–cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH. *Mol Reprod Dev.* 1997;46:296-305.
18. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology.* 2007;67:6-15.
19. Curcio BR, Leon PMM, Junior FF, Nogueira CEW, Deschamps JC. Equinos: oogênese, foliculogênese e maturação. *Rev Bras Reprod Anim.* 2006;30:28-35.
20. Dekel N. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;234:19-25.
21. Sandri LR. Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultra-estrutura de oócitos e sua consequência na produção de embriões in vitro [dissertação]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria; 2007.
22. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* 1997;47:23-32.
23. Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, et al. Evaluation of developmental competence, nuclear, and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1996;45:521-34.
24. Thibault C, Szöllösi D, Gérard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev.* 1987;27:865-96.
25. Carneiro GF, Liu IKM, Hyde D, Anderson GB, Lorenzo PL, Balli BA. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev.* 2002;63:451-8.

26. Kruip T, Cran D, Van Beneden T, Dieleman S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vitro. *Gamete Res.* 1983;8:28-47.
27. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 2006;65:126-36.
28. Gandolfi BTAL, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology.* 2001;55:1255-76.
29. Tomek W, Torner H, Kanitz W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2002;37:86-91.
30. Lin R. Maternal mRNA and the polyA tail. *Nature Educ.* 2010;3:47.
31. Wehrend A, Meinecke B. Kinetics of progression, M-phase promoting factor (MPFP and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim Reprod Sci.* 2001;66:175-84.
32. Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:7323-8.
33. Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica básica.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
34. Downs SM, Dunn HM. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Dev Biol.* 1995;172:72-85.
35. Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:237-72.
36. Tsafiriri A, Chun S, Zhang R, Hsueh AJW, Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of camp levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol.* 1996; 178:393-402.
37. Su YQ, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'brien MJ, Eppig JJ. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev Biol.* 2003;263:126-38.
38. Campbell JS, Seger R, Graves JD, Graves LM, Jensen AM, Krebs EG. The MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res.* 1995;50:131-59.
39. Sagata N. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays.* 1997;19:13-21.
40. Oh B, Hampl A, Eppig JJ, Solter D, Knowles B. Spin. A substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1998;50:240-9.

41. Sun QY, Wu GM, Lai LX, Bonk A, Cabot R, Park KW, et al. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 2002;66:580-8.
42. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* 1990; 344:503-8.
43. De Vantéry C, Gavin AC, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev Biol.* 1996;174:335-44.
44. Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Cell.* 1988;54:433-9.
45. Nebreda AR, Hunt T. The *c-mos* proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J.* 1993;12:1979-86.
46. Josefsberg LB, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol Reprod.* 2003;68:1282-90.
47. Dekel N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev Reprod.* 1996;1:82-8.

**Recebido em: 25/10/10**

**Aceito em: 27/10/11**