

AVALIAÇÕES DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS

Ester Siqueira Caixeta¹

Margot Alves Nunes Dode²

RESUMO

Mesmo com todos os avanços obtidos no sistema de produção *in vitro* de embriões, pouco incremento nas taxas de produção tem sido alcançado. Sendo que a porcentagem de embriões produzidos de ovócitos maturados *in vitro* ainda é inferior àqueles maturados *in vivo*. Inúmeros fatores interferem no sucesso da maturação, entretanto a competência ovocitária é um dos fatores mais importantes. Apenas ovócitos competentes são capazes de sofrer a fecundação e ter desenvolvimento embrionário normal. Portanto, a identificação de ovócitos competentes é fundamental para melhorar os resultados das técnicas de reprodução assistida (TRAs) e também para a realização de estudos nessa área. Vários parâmetros podem ser utilizados como indicativos da competência tais como morfologia do ovócito, tamanho do folículo, coloração com *brilliant cresyl blue* (BCB), momento da clivagem e idade da doadora. Mais recentemente esses parâmetros têm sido utilizados para os estudos de expressão gênica associados à competência. Vários genes candidatos já têm sido identificados, entretanto, o mecanismo pelo qual ocorre a aquisição dessa competência ainda não está completamente elucidado. Esses estudos são fundamentais para a identificação desses mecanismos, permitindo desta forma, definir sistemas mais eficientes que permitam aumentar a disponibilidade de ovócitos competentes e otimizar as TRAs.

Palavras-chave: ovócito, maturação, expressão gênica.

ASSESSMENTS OF COMPETENCE IN BOVINE OOCYTE

ABSTRACT

Although substantial progress has been made in the *in vitro* production systems, little increase in the blastocyst rates has been achieved. The percentage of embryos that are able to have normal development is still lower in oocytes matured *in vitro* than in those matured *in vivo*. Several factors affect the success of maturation, however the oocyte competence is one of the most important. Only competent oocytes are capable of being fertilized and have a normal embryonic development. Therefore, the identification of competent oocytes is essential to improve the performance of assisted reproduction techniques (ARTs), as well as to conduct studies involving such theme. Several parameters can be used as indicative of competence such as morphology, size of the follicle, staining with brilliant cresyl blue (BCB), first cleavage and donor's age. More recently these parameters have been used for studies of gene expression associated with competence. Several candidate genes have been identified, however, the mechanisms involved in its acquisition are still not well known. These studies are critical in order to identify these mechanisms, which then would allow to define more

¹ Mestranda em Ciências Animais da Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, 70910-970 - ecaixeta@gmail.com

² Pesquisadora- Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. margot@cenargen.embrapa.br

Correspondência: Margot Alves Nunes Dode. Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final) Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - 70770-900, Tel.: (61)3448.4659.

efficient systems to increase the availability of competent oocytes and ultimately, to optimize the use of ARTs.

Key words: oocyte, maturation, gene expression.

EVALUACIONES DE LA COMPETENCIA DE OOCITOS EN BOVINOS

RESUMEN

Incluso con todos los avances logrados en el sistema de producción de embriones *in vitro*, poco aumento de la tasa de producción ha sido logrado. Dado que el porcentaje de embriones producidos de oocitos madurado *in vitro* todavía es inferior a los madurados *in vivo*. Varios factores afectan el éxito de la madurez, sin embargo, la competencia de oocitos es uno de los factores más importantes. Oocitos competentes sólo son capaces de ser fecundado y tener un desarrollo embrionario normal. Por lo tanto, la identificación de los oocitos competentes es esencial para mejorar el rendimiento de las técnicas de reproducción asistida (TRAs) y también para los estudios en esa esfera. Varios parámetros pueden ser utilizados como indicativos de la competencia, tales como la morfología, el tamaño del folículo, la tinción *brilliant cresyl blue* (BCB), la primera división embrionaria y edad de la donante. Más recientemente, estos parámetros se han utilizado para estudios de expresión de genes asociados a la competencia. Varios genes candidatos han sido identificados, pero el mecanismo por el cual la adquisición es que aún no está totalmente dilucidado. Estos estudios son fundamentales para la identificación de estos mecanismos, lo que permite definir sistemas más eficientes para aumentar la disponibilidad de oocitos competentes y optimizar las TRAs.

Palabras-clave: oocitos, la maduración, la expresión génica.

INTRODUÇÃO

Com o estabelecimento da produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido possível explorar cada vez mais o potencial reprodutivo das fêmeas. Essa técnica tem sido amplamente utilizada em rebanhos bovinos, como opção para a multiplicação de animais de interesse econômico. No Brasil essa biotecnologia foi rapidamente incorporada ao setor produtivo, de tal forma que nos últimos quatro anos o país foi responsável por 50% da produção de embriões *in vitro* do mundo (1). Porém, mesmo com todos os avanços da técnica de PIVE, pouco incremento nas taxas de produção foi alcançado. Considerando que aproximadamente 60-80% dos ovócitos maturados *in vivo* são competentes para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, comparado com somente 25-40% dos maturados *in vitro* (2), pode-se sugerir que a maturação ainda é um dos problemas na PIVE.

Na maturação ocorrem mudanças nucleares e citoplasmáticas que conferem ao ovócito a capacidade de dar origem a uma nova vida. Ela ocorre espontaneamente quando os ovócitos são removidos de seus folículos, sendo que vários fatores podem interferir no sucesso da maturação, tais como a qualidade do ambiente folicular, tamanho do folículo de origem, morfologia do complexo cumulus-ovócito, condições de maturação e principalmente a competência ovocitária (3).

A competência do ovócito se refere à sua capacidade de ser fecundado e de formar um embrião viável (4). Ela é progressivamente adquirida durante as fases finais da foliculogênese por uma série de modificações celulares e moleculares que são dependentes de múltiplos fatores.

A avaliação morfológica tem sido rotineiramente utilizada como critério para selecionar ovócitos de melhor qualidade (5-7). Entretanto é conhecido que a avaliação morfológica por si só é insuficiente para distinguir ovócitos competentes que têm a habilidade de levar uma gestação à termo (7, 8). Outros parâmetros como, tamanho do folículo, coloração com *brilliant cresyl blue* (BCB), momento da clivagem e idade da doadora, também vêm sendo utilizados como indicativos da competência, na tentativa de se fazer uma seleção mais precisa e que realmente reflita a competência dos ovócitos. Mais recentemente esses parâmetros têm sido utilizados em estudos de expressão gênica associados à competência na tentativa de elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos nesse evento, que determina o futuro do ovócito.

Assim, uma seleção mais rigorosa que permita a identificação de ovócitos competentes é de grande importância para melhorar os resultados de produção e qualidade dos embriões obtidos por técnicas de reprodução assistida (TRAs). Além disso, forneceria ferramentas adequadas para os estudos que visam identificar os fatores que regulam a aquisição da competência. Esse conhecimento é fundamental para indicar as alterações necessárias para que o sistema *in vitro* possa ser o mais semelhante possível do *in vivo*, e com isso aumentar a disponibilidade de ovócitos de melhor qualidade para serem utilizados nas TRAs.

Esta revisão tem como objetivo abordar alguns parâmetros atualmente utilizados como indicativos da competência ovocitária e reunir evidências da literatura sobre os avanços alcançados nessa área utilizando técnicas de biologia molecular como ferramentas alternativas.

Competência Ovocitária

A competência ovocitária é definida como a habilidade ou potencial de um ovócito passar pela maturação, ser fecundado, desenvolver até o estágio de blastocisto e ter a capacidade de induzir uma gestação (2, 4, 9). Essa competência é progressivamente adquirida durante os estágios finais da foliculogênese, por várias alterações celulares e moleculares que proporcionam ao ovócito capacidade para o desenvolvimento embrionário após a fecundação (8).

A maturação se refere ao estágio final de preparação do ovócito para ser fecundado, e envolve modificações nucleares e citoplasmáticas. A maioria dos ovócitos recuperados a partir de folículos antrais é capaz de completar a maturação nuclear, mas apenas os competentes são capazes de ter desenvolvimento embrionário normal, isto é, nem todos que completam a maturação nuclear têm a capacidade de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Essa diferença pode ser atribuída ao “status” de maturação citoplasmática e molecular que difere entre os competentes e incompetentes (4, 9).

A maturação nuclear se refere à habilidade de retomar e completar a meiose. Ela é adquirida progressivamente durante o crescimento do ovócito e do folículo. Quando o ovócito atinge aproximadamente 100 μm ele tem competência para retomar a meiose e sofrer a quebra da vesícula germinativa, e com cerca de 110 μm ele adquire a competência para completar a maturação até o estágio de metáfase II (10). Em algumas espécies, a capacidade de atingir a metáfase I é adquirida antes da capacidade de atingir a metáfase II (2, 4). Em bovinos, a capacidade para atingir os dois estágios é adquirida ao mesmo tempo, porém, deficiências em fatores que regulam o ciclo celular podem resultar na retenção em metáfase I, indicando que as duas etapas requerem mecanismos moleculares distintos (4).

A retomada da meiose é induzida pelo pico de LH, ou ocorre espontaneamente quando os ovócitos são removidos de seus folículos (4). Os eventos nucleares envolvem o rompimento do envoltório nuclear, a reorganização da rede de microtúbulos, condensação e alinhamento equatorial dos cromossomos, e progressão da meiose até a expulsão do primeiro

corpúsculo polar com retenção no estágio de metáfase II (11). Os ovócitos bovinos podem atingir a metáfase II mesmo na ausência de qualquer agente estimulador, como por exemplo, as gonadotrofinas (12). Comparando ovócitos maturados *in vivo* versus *in vitro* não existe diferença aparente na taxa de maturação nuclear, avaliada pela porcentagem de ovócitos que atingiram o estágio de metáfase II (13).

A primeira evidência da competência citoplasmática ocorre quando o ovócito diminui ou interrompe a atividade transcricional havendo a condensação do nucléolo. A segunda série de modificações envolve a redistribuição das organelas como as mitocôndrias e ribossomos, a redução do aparelho de Golgi, aumento no conteúdo de lipídeos e o alinhamento dos grânulos corticais próximos a membrana plasmática (4, 11, 14). Portanto, a maturação citoplasmática está associada com as mudanças celulares que permitem que a fecundação ocorra com sucesso (3).

Um aspecto importante durante o crescimento do ovócito é seu alto grau de atividade transcricional, portanto, mudanças moleculares podem ser responsáveis pelo aumento na competência dos ovócitos. Os eventos moleculares se referem a essas modificações, que envolvem síntese, degradação e alterações de RNAm e proteínas, favorecendo o ovócito com o estoque molecular necessário para a fecundação e os eventos posteriores (9, 15). A transcrição materna diminui marcadamente antes da maturação do ovócito, quando o folículo tem em torno de 3 mm (14). A partir deste ponto a transcrição continua em nível bem menor, sugerindo que as proteínas e transcritos que foram estocados não são substituídos, pelo contrário, são gradualmente traduzidos ou degradados até o momento da ativação do genoma embrionário, a transição materno-zigótica (TMZ), de forma a suprir as necessidades da fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (7, 16).

Parâmetros utilizados como indicativos da competência ovocitária

Um dos parâmetros mais utilizados e conhecidos para selecionar ovócitos com maior competência para o desenvolvimento é baseado na morfologia do complexo cumulus-ovócito (COC). Tem sido mostrado que existe uma relação entre a aparência das células do cumulus e citoplasma do ovócito, com a sua capacidade de produção embrionária *in vitro*. As avaliações morfológicas do COC são baseadas na quantidade e compactação das células do cumulus e homogeneidade de citoplasma (5, 6, 7, 17). A maioria dos autores descreve quatro categorias de COCs, sendo o grau 1 aqueles COCs com citoplasma homogêneo e com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus, o grau 2, aquele que apresenta citoplasma com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e cumulus compacto menor do que na categoria 1, mas com pelo menos cinco camadas completas. Já o grau 3, compreende um ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, coberto com pelo menos três camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas, e o grau 4 ovócito com citoplasma heterogeneamente pigmentado e cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido (6). Os COCs classificados como grau 1 são considerados os mais competentes para o desenvolvimento embrionário e os COCs grau 4, os menos competentes para a produção *in vitro* de embriões (17).

Outro método que vem sendo recentemente testado e utilizado para a seleção de ovócitos mais homogêneos e competentes é o corante *brilliant cresyl blue* (BCB) (18). O BCB é um corante vital azul que determina a atividade intracelular da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima sintetizada durante a fase de crescimento do ovócito, mas que tem um decréscimo da atividade em ovócitos completamente crescidos (19, 20-22). Essa enzima é importante no fornecimento de energia para a síntese de nucleotídeos e formação de ácidos graxos. O citoplasma dos ovócitos com menor atividade da G6PD se torna azul (BCB positivo), pois eles não têm a capacidade de reduzir o BCB a compostos incolores (17, 23,

24). O teste do BCB permite a seleção de ovócitos com maior diâmetro, com maior capacidade de atingir a metáfase II, formar os pró-núcleos e com maior capacidade para se desenvolver até o estágio de mórula e blastocisto, comparado com ovócitos BCB negativo e aqueles selecionados exclusivamente por critérios morfológicos (17).

A maioria dos autores tem concluído que o BCB teste é uma forma eficiente para selecionar ovócitos mais competentes para a produção de embriões *in vitro* (17, 19, 21, 22), mas que a competência dos ovócitos BCB positivo pode variar com o diâmetro ovocitário, maturidade sexual e estimulação com gonadotrofinas (21). É importante ressaltar que o teste BCB seleciona apenas os ovócitos que atingiram o crescimento total, sendo esta característica somente um dos fatores envolvidos na aquisição da competência ovocitária.

Existe também, uma correlação evidente entre o tamanho do folículo e a competência do ovócito. Tem sido demonstrado em vários trabalhos (25-33) que ovócitos provenientes de folículos maiores têm maior potencial de desenvolvimento que os de folículos menores, gerando maior taxa de produção de embriões *in vitro*. Assim como no teste BCB, essa maior competência pode estar relacionada com maior diâmetro do ovócito, visto que existe uma correlação entre o diâmetro do ovócito e tamanho do folículo e, conseqüentemente, com a capacidade de desenvolvimento (14, 34).

Outro parâmetro utilizado como indicativo da competência aponta para a existência de correlação entre o momento da primeira clivagem após a inseminação e a capacidade de desenvolvimento embrionário em bovinos (35-37), sendo que aqueles ovócitos que clivam mais cedo após a fecundação têm maior capacidade de atingir o estágio de blastocisto que aqueles que clivam mais tarde, sendo considerados ovócitos mais competentes (38, 39).

Finalmente, tem sido relatado que ovócitos de animais pré-púberes são menos competentes para o desenvolvimento comparado com ovócitos de fêmeas adultas (17, 40-42). Presicce e colaboradores (41) propuseram que ovócitos de bezerras de 5 a 7 meses de idade apresentam baixa taxa de clivagem e conseqüentemente são pouco competentes para produção de embriões viáveis. As fêmeas que estão atingindo a puberdade, com 9 meses de idade adquirem gradativamente a competência para sofrer a clivagem e, um aumento na competência para o desenvolvimento embrionário é adquirido com aproximadamente 11 meses de idade.

Essa redução na competência de ovócitos de fêmeas pré-púberes pode ser em parte, atribuído ao menor tamanho do ovócito, diferenças na síntese protéica e metabolismo energético, atraso na migração das organelas citoplasmáticas e redução da atividade de algumas enzimas (17, 41).

Estudos de genes associados à competência ovocitária

Considerando que os ovócitos de mamíferos possuem a necessidade de acumular todos os fatores maternos necessários para os eventos pós-fecundação (9, 15, 29), existe um consenso de que a competência do ovócito está relacionada com a abundância de transcritos específicos, que foram estocados durante o crescimento do ovócito e fase final da foliculogênese (4, 43, 44, 45). Estas informações, portanto, sugerem que diferenças entre ovócitos competentes e incompetentes podem estar relacionadas a um padrão diferencial de expressão gênica. Apesar de alguns genes já terem sido identificados como relacionados com a competência do ovócito (9, 16, 33, 39, 46), os mecanismos envolvidos na sua aquisição não são totalmente conhecidos. Portanto, a caracterização molecular é importante não somente nos estudos que buscam elucidar os mecanismos necessários para que o ovócito adquira a competência, mas também na tentativa de proporcionar importantes marcadores moleculares relacionados com a capacidade de desenvolvimento. Uma abordagem que pode ser utilizada

na investigação desses mecanismos é a comparação de ovócitos com diferentes graus de competência.

Como já mencionado, o momento da primeira clivagem está claramente relacionado com a competência ovocitária, sendo que os zigotos que sofreram a primeira divisão mais cedo após a fecundação, possuem maior competência para atingir o estágio de blastocisto, e por isso, o momento da primeira clivagem se tornou um modelo para a avaliação dos mecanismos relacionados à competência (38, 47). Esse modelo assume que os genes maternos podem ser identificados nos embriões de duas células, momento em que apenas um baixo nível de transcrição pode ser detectado nos bovinos (46). Lonergan e colaboradores (36) mostraram que embriões de 2 células derivados de ovócitos que clivaram entre 27 e 30 horas após a inseminação (hpi) apresentaram maior nível de transcritos para os genes G6PD e HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase*), comparado com aqueles que clivaram 33 hpi. Fair e colaboradores (46) encontraram maior expressão da Histona H3A em embriões que clivaram mais cedo. Da mesma forma, Dode e colaboradores (39) detectaram maior expressão no nível de transcritos para genes IDH, Histona H2A e YEAF em embriões que clivaram entre 24 e 32 hpi quando comparado aos que clivaram entre 36 e 44 hpi.

Além disso, a Histona H2A também foi mais expressa em populações de ovócitos mais competentes, oriundos de folículos maiores, quando se utilizou o modelo do tamanho do folículo (16, 48). As histonas são fundamentais para a divisão celular e também são necessárias para substituir as protaminas durante a descondensação do DNA dos espermatozoides após a penetração no ovócito (49). A partir do início da maturação até a TMZ duas divisões meióticas e três a quatro replicações de DNA ocorrem sem nenhuma nova transcrição de histonas, por isso, grande quantidade de RNAm e proteínas maternas precisam ser estocadas (16). Portanto, as histonas são críticas desde o momento da maturação e fecundação, sendo que níveis deficientes podem afetar a clivagem e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário (39). Todos estes dados indicam a importância das histonas nos eventos após a fecundação e a necessidade do ovócito de ter estoque adequado de RNAm para essas proteínas.

Além da H2A, Mourot e colaboradores (16) encontraram maior nível de RNAm de outros genes como, PSMB2, SKIIP, CDC5L, RGS16, PRDX1, CCNB2, PTTG1 e CKS1 em folículos maiores que 8,0 mm. Estes genes estão relacionados com a regulação do ciclo celular, metabolismo celular e sinalização celular, indicando que ovócitos competentes estocam maior quantidade de RNAm que codificam proteínas envolvidas no ciclo celular para garantir que as mesmas não sejam limitantes para o desenvolvimento do embrião.

Ainda utilizando o modelo do tamanho do folículo como indicador da qualidade do ovócito, Donnison e Pfeffer (9) identificaram que ovócitos obtidos de folículos >5 mm possuíam maior quantidade de transcritos de genes como: GDF9, Oct4, Ciclina A e SLBP quando comparado com os ovócitos de folículos <2 mm. É importante ressaltar que a SLBP é uma proteína que tem função na estabilização, ativação e tradução de RNAm de histonas durante a maturação do ovócito e após a fecundação. Ela exerce sua função biológica pela ligação na região stem-loop dos RNAm das histonas (9, 50, 51). Em contraste, Caixeta et al. (48) não encontraram expressão diferencial da SLBP de acordo com o tamanho do folículo. Diferenças na metodologia podem ser responsáveis pelas dissimilaridades nos resultados, considerando que estes autores utilizaram diferentes tamanhos de folículo.

Mais recentemente, Racedo et al. (33) encontraram maior expressão de transcritos dos genes DYNLL1 e DYNC111 em ovócitos oriundos de folículos maiores. Esses genes são importantes durante a maturação do ovócito e estão relacionados com o transporte de moléculas.

Quando foi utilizado o método do corante BCB como indicador de ovócitos competentes e incompetentes 85 genes foram mais expressos em ovócitos BCB positivos,

pela análise por microarranjo. A maioria dos genes com maior expressão em ovócitos BCB positivo estava associada com a regulação do ciclo celular como a NASP, uma proteína ligante de histona H1, ou com a transcrição (SMARCA5) e tradução (EEF1A1, RPS27A). Esses resultados sustentam a hipótese de que ovócitos com maior estoque de transcritos relacionados com o ciclo celular, transcrição e biosíntese de proteínas têm maior capacidade de retomar a meiose e suportar a transição materno-zigótica (22).

Ovócitos de fêmeas pré-púberes comparados com ovócitos de vacas adultas possuem menor taxa de blastocistos e também permitem o estudo da competência ovocitária (40). Patel e colaboradores (52) encontraram 193 genes com maior abundância de RNAm em ovócitos de fêmeas adultas comparado com ovócitos de animais pré-púberes. Após uma classificação funcional dos genes foi observado que os ovócitos de fêmeas adultas possuíam mais transcritos importantes na regulação de secreção hormonal e biosíntese de macromoléculas. As análises para validação desses resultados confirmaram a maior abundância de RNAm dos genes folistatina e subunidades beta A e beta B da inibina/ativina em ovócitos de vacas adultas. Além disso, os mesmos autores encontraram maior expressão de transcritos da folistatina em embriões que clivaram mais cedo após a fecundação.

A identificação desses genes que são mais expressos em ovócitos mais competentes sugere que eles tenham um papel importante na competência ovocitária. Porém é necessário entender as suas funções nos mecanismos responsáveis pela aquisição da competência e as informações de quais alterações no ambiente do ovócito podem afetar seu progressivo acúmulo nos estágios finais da foliculogênese.

Além do mais, deve-se considerar que os níveis de RNAm podem ser afetados não só pela transcrição, mas também pelo processamento e degradação dos transcritos. Em adição, a quantidade de RNAm pode não corresponder aos níveis de tradução da proteína, sendo que somente após a avaliação do conteúdo da proteína correspondente será possível relacionar a quantidade de RNAm e seu papel funcional no desenvolvimento embrionário (39).

Considerações Finais

Em síntese, apenas ovócitos competentes são capazes de sofrer a fecundação, ter desenvolvimento embrionário normal e resultar em uma gestação. Portanto, o sucesso das técnicas de reprodução assistida depende da maior disponibilidade de ovócitos competentes, isso só pode ser atingido a partir do conhecimento dos fatores que afetam a competência e dos mecanismos envolvidos na sua aquisição. A utilização de ferramentas moleculares disponíveis tem permitido o avanço no conhecimento da variação gênica que é um dos fatores responsáveis pela competência. Com a identificação e avaliação funcional desses genes será possível determinar as condições mais adequadas e reproduzi-las *in vitro* melhorando a eficácia das técnicas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

1. Viana JHM, Camargo LSA. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. In: Anais do 21º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; 2007, Salvador. Salvador: SBTE; 2007. p.915-9.
2. Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herrick JR, Kennedy-Stoskopf S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. Anim Reprod Sci. 2007; 98: 97-112.

3. Dode MAN. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: Anais do 21º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; 2006, Araxá. Araxá: SBTE; 2006. p.115-29.
4. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006; 65: 126-36.
5. de Wit AAC, Wurth YA, Kruip TAM. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci*. 2000; 78: 1277-83.
6. Stojkovic M, Machado AS, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, et al. 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*. 2001; 64: 904-9.
7. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*. 2003; 38: 259-67.
8. Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann. N Y Acad Sci*. 2004; 1034: 132-44.
9. Donnison M, Pfeffer PL. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. *Biol Reprod*. 2004; 71: 1813-21.
10. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 1997; 47: 23-32.
11. Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev*. 2007; 19: 1-12.
12. Dode MAN, Adona PR. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci*. 2001; 65: 157-70.
13. Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*. 1996; 42: 417-26.
14. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*. 2003; 78: 203-16.
15. Song JL, Wessel GM. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation*. 2005; 73: 1-17.
16. Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard, MA. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol Reprod Dev*. 2006; 73: 1367-79.
17. Pujol M, López-Béjar M, Paramio MT. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*. 2004; 61: 735-44.

18. Ghanem N, Hölker M, Rings F, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, et al. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *Dev Biol.* 2007; 7: 1-19.
19. Rodríguez-González E, López-Béjar M, Velilla E, Paramio MT. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology.* 2002; 57: 1397-409.
20. Bhojwani S, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology.* 2007; 67: 341-5.
21. Wu YG, Liu Y, Zhou P, Lan D, Miao DQ, Tan JH. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining a study using the mouse model. *Cell Res.* 2007; 17: 722-31.
22. Torner H, Ghanem N, Ambros C, Holker M, Tomek W, Phatsara C, et al. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction.* 2008; 135: 197-212.
23. Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology.* 2005; 63: 2194-205.
24. Opiela J, Katska-Ksiazkiewicz L, Lipinski D, Słomski R, Bzowska M, Rynska B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology.* 2008; 69: 546-55.
25. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1994; 37: 48-53.
26. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1995; 41: 54-62.
27. Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ, et al. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev.* 1999; 53: 451-8.
28. Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology.* 2004; 61: 329-35.
29. Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbiès-Tran R, et al. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology.* 2005; 63: 841-59.
30. Woudenberg ARB, Zeinsttra EC, Roelen BAJ, Colenbrander B, Bevers MM. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase

- activity: effect of estradiol supplementation and follicle size. *Anim Reprod Sci.* 2006; 92: 231-40.
31. Caixeta ES, Leme LO, Machado GM, Rumpf R, Franco MM, Dode MAN. Competência ovocitária de acordo com o tamanho folicular. In: *Anais do 21º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; 2007, Salvador. Salvador: SBTE; 2007. p.1156.*
 32. Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology.* 2007; 67: 1339-50.
 33. Racedo SE, Wrenzycki C, Herrmann D, Salamone D, Niemann H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2008; 75: 17-25.
 34. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev Sci Tech.* 2005; 24: 413-23.
 35. Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology.* 1998; 50: 1285-99.
 36. Lonergan P, Rrez-ADAâ AG, Pintado B, Fair T, Ward F, de La Fuente J, et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I Growth Factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2000; 57: 146-52.
 37. Caixeta ES, Siqueira Filho E, Franco MM, Dode MAN, Rumpf R. Influência do momento da primeira clivagem no desenvolvimento e sua relação com o sexo dos embriões em bovinos. In: *Anais do 22º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; 2008, Guarujá. Guarujá: SBTE; 2008. p.496.*
 38. Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil.* 1999; 117: 159-67.
 39. Dode MAN, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev.* 2006; 73: 288-97.
 40. Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil.* 1995; 103: 115-20.
 41. Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, et al. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod.* 1997; 56: 386-92.

42. Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, DUBY RT. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod.* 2001; 64: 1761–8.
43. Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard MA. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2000; 57: 167-75.
44. Gandolfi TA, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology.* 2001; 55: 1255-76.
45. Maddox-Hyttel P, Bjerregaard B, Laurincik J. Meiosis and embryo technology: renaissance of the nucleolus. *Reprod Fertil Dev.* 2005; 17: 3-14.
46. Fair T, Murphy M, Rizos D, Moss C, Martin F, Boland MP, et al. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev.* 2004; 67: 136-44.
47. Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Fair T, Moreira PN, Pintado B, de La Fuente J, et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2004; 68: 441-8.
48. Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Buratini JR J, Dode MAN. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev.* 2009; 21: 655-64.
49. Andrade CGT, Jordão BQ. O núcleo da célula. In Junqueira CL, Carneiro J. *Biologia celular e molecular.* 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.141-97.
50. Allard P, Champigny MJ, Skoggard S, Erkmann JA, Whitfield ML, Marzluff WF, et al. Stem-loop binding protein accumulates during oocyte maturation and is not cell-cycle-regulated in the early mouse embryo. *J Cell Sci.* 2002; 115: 4577-86.
51. Allard P, Yang Q, Marzluff WF, Clarke HJ. The stem-loop binding protein regulates translation of histone mRNA during mammalian oogenesis. *Dev Biol.* 2005; 286: 195-206.
52. Patel OV. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor development competence of bovine oocytes. *Reproduction.* 2007; 133: 95-106.

Recebido em: 09/02/2009

Aceito em: 22/10/2009