

AVANÇOS NA MATURAÇÃO OVOCITÁRIA EM BOVINOS

Margot Alves Nunes Dode

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia PqB Final W5 Norte, Brasília, DF 70770-900

Telefone: (61) 3340 3459; Fax: (61)33403657; margot@cenargen.embrapa.br

Resumo

A maturação envolve mudanças nucleares, citoplasmáticas e moleculares que conferem ao ovócito a capacidade de se desenvolver ao estágio de blastocito, sendo um processo chave na produção *in vitro* de embriões. Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos, a percentagem de embriões produzidos de ovócitos maturados *in vitro* ainda é inferior àqueles maturados *in vivo*. Vários fatores afetam o sucesso da maturação *in vitro*, dentre eles a presença das células do cumulus e as condições de cultivo tem destacada importância. Entretanto, o fator mais importante em determinar o destino final do ovócito é a sua competência para o desenvolvimento. Em que momento ocorre a aquisição dessa competência e qual o mecanismo responsável, ainda não são conhecidos. Estudos indicam que a competência está determinada pela composição e quantidade de transcritos, que são estocados durante o crescimento e fase final da foliculogênese. Portanto, a diferença entre ovócitos competentes e incompetentes se deve a expressão diferenciada de genes. Somente pela identificação e avaliação funcional de genes associados à competência, será possível desvendar os mecanismos envolvidos na sua aquisição. Esse conhecimento possibilitará a definição de sistemas mais eficientes, para aumentar a disponibilidade de ovócitos com capacidade de desenvolvimento e, otimizar a utilização das técnicas de reprodução assistida. **Palavras chaves:** ovócito, maturação, competência, expressão gênica.

Introdução

A maturação de ovócitos é um procedimento chave na produção *in vitro* de embriões (PIV), visto que as demais etapas do processo dependem da quantidade de ovócitos maduros e com potencial de desenvolvimento (Dieleman *et al.*, 2002). Portanto, o sucesso tanto da PIV como de várias técnicas de reprodução assistida dependem, basicamente, da disponibilidade de uma população uniforme e competente de ovócitos imaturos para serem utilizados na maturação *in vitro*.

Mesmo após a rigorosa seleção de ovócitos, a taxa de produção de embriões viáveis é menor em ovócitos maturados *in vitro* do que naqueles produzidos *in vivo* (Van de Leemput *et al.*, 1999; Takagi *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2002). Portanto, pode-se supor que a maturação ainda é um fator limitante na PIV, e que apesar de milhares de produtos terem sido produzidos a partir de ovócitos imaturos em bovinos, os eventos fisiológicos que ocorrem durante a maturação são pouco conhecidos.

Inúmeras evidências têm sido apresentadas nos últimos anos indicando que o potencial de desenvolvimento de embriões *in vitro*, depende da qualidade dos ovócitos dos quais se originam (Sirard *et al.*, 2003, Lonergan *et al.*, 2003, Rodriguez & Farin, 2004), sendo que essa qualidade afeta não só o desenvolvimento embrionário, mas também a prenhez e o desenvolvimento fetal

posterior (Krisher, 2004). A maioria dos ovócitos proveniente de folículos antrais é capaz de completar a maturação nuclear, mas somente os competentes têm a capacidade de ter desenvolvimento embrionário normal (Sirard *et al.*, 2006). Os mecanismos que controlam a aquisição dessa competência têm sido extensivamente estudados, e as pesquisas nessa área estão sendo progressivamente direcionadas para uma abordagem mais molecular, na tentativa de elucidar esses mecanismos.

Essa revisão aborda alguns aspectos celulares e moleculares da maturação ovocitária e aquisição da competência, que afetam a capacidade do ovócito de sustentar o desenvolvimento embrionário.

Maturação Ovocitária

Durante a ovogênese, os ovócitos de mamíferos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação (Wassarman & Albertini, 1994). A retomada da meiose pode ser mediada por um estímulo hormonal *in vivo*, em resposta ao pico pré-ovulatório de LH, ou pela retirada do ovócito de dentro do folículo. Sendo o período da maturação o estágio final da preparação do ovócito para a fecundação.

Somente ovócitos competentes têm a capacidade de sofrer a maturação completa. Essa competência é progressivamente adquirida durante os estágios finais da foliculogênese, através de várias mudanças celulares e moleculares que conferem ao ovócito a capacidade de completar a divisão meiótica, garantir uma fecundação monospérmica, descondensar a cabeça do espermatozoide, transpor a transição materno-zigótica (MZT) e prosseguir o seu desenvolvimento (Coticchio *et al.*, 2004). Portanto, quando um ovócito imaturo é removido do folículo ele deve ser capaz de sofrer não só a maturação nuclear e citoplasmática, mas também a maturação molecular. A maturação molecular, apesar de ser um componente da citoplasmática (Sirard, 2001), pode ser abordada separadamente devido a sua complexidade.

Os eventos nucleares que ocorrem durante a maturação envolvem a reorganização da rede de microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos e progressão da meiose para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (Cha & Chian, 1998). A programação da maturação nuclear no ovócito é automaticamente ativada após a sua remoção do folículo (Sirard *et al.*, 2006). Os ovócitos que atingem o seu crescimento total completam a maturação nuclear, mesmo na ausência de qualquer agente estimulador como, por exemplo, as gonadotrofinas (Dode & Adona, 2001; Ali & Sirard, 2005). A retomada da meiose induz a inativação da transcrição e imediatamente limita o programa molecular do ovócito requerido para passar a MZT. Portanto, ações para modificar o programa molecular do ovócito devem ocorrer antes do rompimento da vesícula germinativa (GVBD).

O primeiro indicativo de mudança citoplasmática é a compactação do nucléolo, sugerindo a diminuição e/ou perda da atividade transcricional (Fair *et al.*, 1995; Hyttell *et al.*, 1997). Ainda durante a maturação, ocorrem mudanças na organização do citoplasma tais como um contínuo desenvolvimento dos estoques de lipídios, redução do aparelho de Golgi, redistribuição de ribossomos, rearranjo das mitocôndrias, e alinhamento dos grânulos corticais próximo à membrana plasmática (Hyttell *et al.*, 1997). Portanto, a maturação citoplasmática está associada com as mudanças celulares que permitem que a fecundação ocorra com sucesso.

Um aspecto importante durante o crescimento do ovócito é seu alto grau de atividade transcricional, refletindo a importância do acúmulo de proteínas e RNAm de origem materna, os quais são necessários não só para o crescimento e maturação mas, especialmente, para o desenvolvimento embrionário inicial (Song & Wessel, 2005). Em mamíferos superiores, o ovócito

precisa acumular, durante a foliculogênese, todos os fatores maternos necessário para sustentar a maturação e o desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário. Em bovinos a retomada da meiose induz a perda da capacidade de transcrição, e apesar de haver uma pequena atividade transcricional no estágio de 1-2 células (Viuff *et al.*, 1996), o aumento substancial nessa atividade só ocorre no estágio de 8-16 células (Memili & First, 2000). A formação desse estoque de RNAm e proteínas de origem materna, que confere ao ovócito o programa molecular necessário para a MZT, se refere à maturação molecular.

Tendo em vista que ovócitos maturados *in vitro* apresentam menores taxas de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro* quando comparados aos *in vivo* (Takagi *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2002), pode-se presumir que o baixo desenvolvimento embrionário se deve a deficiência do ovócito seja na maturação nuclear, citoplasmática ou na molecular. Vários fatores podem afetar o sucesso da maturação ovocitária, entre eles pode-se destacar a morfologia do complexo cumulus-ovócito (CCO), as condições de maturação e a competência do ovócito.

Papel das Células do Cumulus

A associação íntima entre células do cumulus e o ovócito é um requisito básico para o crescimento folicular e ovocitário, para a aquisição da competência e para a coordenação da maturação nuclear e citoplasmática (Vozzi *et al.*, 2001; Fair, 2003; Rodriguez & Farin, 2004; Ali *et al.*, 2005).

O crescimento e desenvolvimento das células somáticas e das célula germinativas que formam o folículo ovariano, é altamente coordenado e mutuamente dependente (Gilchrist *et al.*, 2004). Essas células formam uma unidade funcional consistindo de contato físico, mediado por junções gap, e por sinais parácrinos, sendo essa comunicação bi-direcional (Albertini & Barrett, 2003; Gandolfi *et al.*, 2005). Sinais parácrinos secretados pelo ovócito regulam a função folicular, sendo que os principais são os fatores da superfamília TGF- β , particularmente GDF9, GDF-9B (BMP-15) (Vanderhyden *et al.*, 2003; Gilchrist *et al.*, 2004). As células somáticas, por sua vez, também regulam o ovócito através de secreção de fatores tais como *kit ligand*, esterol ativador da meiose (MAS) e peptídeos semelhantes ao EGF (Byskov *et al.*, 1997; Albertini & Barret, 2003; Gilchrist *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

À medida que o folículo cresce e o antro é formado, as células da granulosa se separam em dois subtipos anatomicamente distintos, as células do cumulus que são íntima e metabolicamente ligadas ao ovócito, e as células murais, que formam a parede do folículo (Gilchrist *et al.*, 2004). As células do cumulus são altamente especializadas e tem projeções celulares que atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções com o citoplasma (gap). Essas junções são formadas por proteínas, as conexinas, que são classificadas de acordo com seu peso molecular (Rodriguez & Farin, 2004), e cuja expressão em bovinos varia com o estágio de desenvolvimento folicular (Fair, 2003). Sendo que a conexina 43 (Cx43) é a mais abundante no ovário e seu estado de fosforilação é o que determina a permeabilidade e condutibilidade das junções gap (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). Essas junções permitem a transferência, direta para o ovócito, de moléculas de pequeno peso molecular tais como íons, metabólitos, nucleotídeos e aminoácidos que são necessários para o seu crescimento, assim como pequenas moléculas reguladoras como o AMPc (Thomas *et al.*, 2004; Gandolfi *et al.*, 2005). Enquanto que, moléculas maiores, são transferidas também por essas junções, mas de forma indireta, ou seja, após se ligarem a seus receptores celulares.

Além de ter um papel importante na manutenção dos ovócitos em estágio de VG (Thomas *et al.*, 2004) e na indução da retomada da meiose (Vozzi *et al.*, 2001), o contato funcional entre

células do cumulus e ovócitos durante a maturação é essencial para expressão da total competência ovocitária (Vozzi *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2005). Visto que, a presença de um inibidor das junções gap, durante o período inicial da maturação, causa uma diminuição drástica na taxa de blastocisto em bovinos (Ali *et al.*, 2005). Além disso, as células do cumulus, que permanecem em contato com os ovócitos, são fundamentais para a regulação da repressão transcricional necessária em ovócitos pré-ovulatórios (De La Fuente, 2006).

Papel das Condições de Cultivo

Além das características morfológicas, as condições de cultivo também afetam o sucesso da maturação *in vitro*. A presença de hormônios, substâncias antioxidantes, fatores de crescimento, temperatura, atmosfera gasosa, tipo de suplemento protéico, e densidade (número de estruturas por volume de meio) são alguns dos fatores que influenciam a maturação (Shi *et al.*, 1998; Khurana & Niemann, 2000; Watson *et al.*, 2000; Dode & Graves, 2002; Dode & Graves, 2003; Beker-van Woudenberg *et al.* 2004; Livingston *et al.*, 2004; Oyamada & Fukui, 2004; Dalvit *et al.*, 2005).

Entretanto, mesmo que modificações no meio de maturação possam afetar a produção de blastocistos *in vitro*, os benefícios obtidos com essas modificações são geralmente modestos e mesmo nos melhores resultados, aproximadamente metade dos ovócitos ainda falha em atingir o estágio de blastocisto. Os efeitos mais marcantes na maturação, quando o meio é modificado, são observados quando os ovócitos são ou não expostos às gonadotrofinas.

O papel do LH *in vivo* é estimular a retomada da meiose, devido à indução da hiperfosforilação da Cx43 que compõem as junções gap, causando com isso o fechamento dessas junções (Pant *et al.*, 2005). Com a perda de comunicação entre essas células, cessa o suprimento de AMPc das células do cumulus para o ovócito, resultando em uma diminuição de sua concentração intra-ovocitária. (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). O LH age nas células somáticas, e seu efeito parece ser mediado por fatores de crescimento semelhantes ao EGF como a epiregulina, anfiregulina e beta-celulina (Conti *et al.*, 2006). Apesar da controvérsia, estudos tem mostrado que a GVBD ocorre após a perda de certo grau da funcionalidade das junções gap (Sutovsky *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2004), mesmo assim é possível que outros efeitos possam estar envolvidos na diminuição do AMPc intra-ovocitário, e na retomada da meiose *in vivo*.

In vitro, a retirada do ovócito de dentro do folículo induz a maturação espontânea (Bever & Izadyar, 2002). A remoção da influência inibitória imposta pelo ambiente folicular causa uma diminuição do AMPc intra-ovocitário, que pode ocorrer passivamente ou por ativação da fosfodiesterase A3 presente no citoplasma do ovócito (Conti *et al.* 1998; Richard *et al.* 2001), causando a retomada da meiose.

Em contraste, quando o FSH está presente ele se liga ao seu receptor nas células do cumulus aumentando o AMPc, que é transmitido para o ovócito através de junções gap (Webb *et al.*, 2002) e ativa dois tipos de proteínas kinase A (PKA) I e II. A PKA I, causa um aumento temporário dos níveis de AMPc no ovócito, prevenindo a GVBD (Rodriguez & Farin, 2004). A ativação da PKA II, por outro lado, resulta na transcrição de genes necessários para o início da maturação. Entretanto, a PKC também tem sido apontada como tendo papel importante na transdução do sinal do FSH, especialmente, no que se refere aos processos de transcrição e tradução que são requeridos para a fase estimulatória da GVBD mediada pelas gonadotrofinas *in vitro* (Ali & Sirard, 2005). É possível que a inibição temporária da retomada da meiose seja essencial para que esses processos ocorram, e com isso a presença do FSH melhore o potencial de desenvolvimento dos ovócitos. O que pode ser comprovado pelo fato do FSH ser necessário

somente nas primeiras horas da maturação *in vitro* (Ali & Sirard, 2005). Portanto, *in vitro*, o FSH e não o LH é o hormônio chave para a maturação ovocitária.

Além das gonadotrofinas outros hormônios têm sido utilizados durante a maturação de ovócitos bovinos com resultados similares aos obtidos com a presença de FSH. O EGF é utilizado rotineiramente em alguns laboratórios em substituição às gonadotrofinas, e seu efeito na expansão da células do cumulus (Lonergan *et al.*, 1996), na maturação (Lonergan *et al.* 1996; Oyamada *et al.*, 2004) e no desenvolvimento embrionário (Watson *et al.*, 2000, Oyamada *et al.*, 2004), tem sido relatado. Entretanto, o envolvimento do EGF, e de outros fatores que fazem parte da grande família do EGF, na maturação não está bem claro (Dekel, 2005).

Da mesma forma, o GH adicionado no meio de maturação, acelera a GVBD, induz a expansão das células (Izadyar *et al.*, 1996), melhora a maturação citoplasmática (Izadyar *et al.*, 1998b) e aumenta as taxas de blastocisto (Izadyar *et al.*, 1996). A adição de GH no meio de maturação provoca uma diminuição significativa nas junções gap e uma menor expressão da Cx43 (Kolle *et al.*, 2003), sugerindo que o efeito do GH em acelerar a meiose se deve a mudanças na comunicação intercelular, agindo nas células do cumulus (Kolle *et al.*, 2003). Apesar de ação do GH e do FSH depender do AMPc, o efeito parece ser diferente no que se refere a acelerar a retomada da meiose, e ao grau de expansão das células do cumulus (Bervers & Izadyar 2002). Mesmo assim, ambos melhoraram as taxas de blastocisto *in vitro* (Izadyar *et al.*, 1998a).

A presença de RNAm para receptor de GH, assim como a presença do próprio hormônio tem sido demonstrado nas células da granulosa, do cumulus e em ovócitos de folículos antrais médios (Izadyar *et al.*, 1997; Kolle *et al.*, 1998). Entretanto, o RNAm para GH está presente somente nas células murais da granulosa (Izadyar *et al.*, 1999) e em ovócitos imaturos e maduros (Joudrey *et al.*, 2003). Além disso, transcritos para Pit-1, que é o regular da transcrição do GH, foram detectados em ovócitos (Joudrey *et al.*, 2003), sugerindo que esse é sintetizado pelo ovócito.

Considerando que a presença de GH e de seu RNAm só foi observada em folículos maiores do que 2 mm de diâmetro e não em folículos pré-antrais ou antrais pequenos (Joudrey *et al.*, 2003), pode-se supor que a capacidade do ovócito de sintetizar GH é adquirida concomitantemente com a capacidade de completar a meiose. Portanto, apesar da ação do GH e sua importância na maturação *in vivo* e *in vitro* não estar clara, é possível que esse tenha um papel fisiológico nesse processo e que possa estar relacionado com a competência ovocitária.

Competência Ovocitária

Existem inúmeras evidências de que a origem do ovócito é crucial em determinar a sua capacidade de ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário normal (Hendriksen *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 2003; Rodriguez & Farin, 2004).

A identificação de novos métodos para selecionar os ovócitos mais competentes tem sido uma busca constante, entretanto, além da morfologia do CCO e do tamanho do folículo, que são extensivamente utilizados em vários laboratórios, nenhum outro parâmetro foi identificado com indicador de competência. Isso, porque as várias mudanças ultra-estruturais e moleculares que ocorrem durante o crescimento do ovócito e que estão associadas com a competência, somente podem ser observadas por métodos invasivo que causam a destruição do ovócito (Hyttell *et al.*, 1997).

Existe uma correlação evidente entre o tamanho dos folículos e a competência dos ovócitos. Ovócitos provenientes de folículos de maior diâmetro apresentam maior potencial de desenvolvimento do que os provenientes de folículos de menor diâmetro (Pavlok *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 1994; Dode *et al.*, 2000; Kauffold *et al.*, 2005). Essa relação foi recentemente

confirmada em um estudo envolvendo três laboratórios distintos, que mostrou que o tamanho do folículo foi altamente relacionado com a capacidade dos ovócitos maturados in vitro de se desenvolverem até o estágio de blastocisto (Lequarre *et al.*, 2005).

Durante a foliculogênese o ovócito cresce até atingir um diâmetro de cerca de 110 μ m, o que corresponde a um tamanho folicular de 3 mm. Nesse estágio é que os ovócitos atingem o seu crescimento, cessam a atividade do nucléolo e adquirem a competência meiótica (Fair *et al.*, 1995; Hyttell *et al.*, 1997; Dieleman *et al.*, 2002; Merton *et al.*, 2003). Apesar da drástica diminuição transcricional que ocorre quando o ovócito completa seu crescimento, a transcrição não é totalmente inativada (Baran *et al.*, 2004) e o diâmetro do ovócito pode ter um pequeno aumento na período final do desenvolvimento folicular (Dode *et al.*, 2000; Bevers & Izadyar, 2002; Gandolfi *et al.*, 2005). Portanto, em folículos entre 3 e 8 mm, o diâmetro do ovócito não muda, a transcrição é praticamente inativada e seu crescimento está completo (Hyttell *et al.*, 1997; Dieleman *et al.*, 2002; Merton *et al.*, 2003).

Em folículos entre 8 e 15 mm de diâmetro, período que corresponde à dominância folicular, o ovócito de mamífero sofre mudanças significativas que se completam antes do pico pré-ovulatório de LH, essas mudanças são chamadas de capacitação ou pré-maturação, e tem papel fundamental na aquisição da competência (Fair *et al.*, 1995; Hyttell *et al.*, 1997; Dieleman *et al.*, 2002; Merton *et al.*, 2003). Entretanto, muitos dos eventos citoplasmáticos e moleculares que ocorrem durante esse período, ainda não são conhecidos (Humblot *et al.*, 2005). Tentativas para elucidar esses mecanismos têm sido realizadas avaliando ovócitos obtidos em diferentes momentos próximos ao pico de LH (Hendriksen *et al.*, 2000; Knijn *et al.*, 2002; Humblot *et al.*, 2005). Entretanto, os resultados são variáveis e não conclusivos, no que se refere à alteração no padrão de expressão de genes durante o período próximo a ovulação. Isso se deve, principalmente, a diferenças nos protocolos de superovulação, momento da aspiração transvaginal (OPU) (Merton *et al.*, 2003), manipulação dos ovócitos (Watson *et al.*, 2000; Merton *et al.*, 2003) e ao pequeno número de genes avaliados. Desta forma, ainda não se conhece a mudança no padrão geral da expressão gênica durante esse período, o que auxiliaria na elucidação dos eventos que ocorrem durante a aquisição da competência.

Diferente do que ocorre in vivo, ovócitos utilizados para OPU e FIV são normalmente obtidos de folículos de 3-8 mm, que não são expostos às mudanças pré-ovulatórias do ambiente folicular, e são menos competentes do que os de folículos acima de 8 mm (Hendriksen *et al.*, 2000). A população de folículos de 3-8 mm de diâmetro é muito heterogênea no que se refere aos estágios de desenvolvimento e grau de atresia (Hendriksen *et al.*, 2000). É possível que a competência, de uma porção desses ovócitos, seja induzida por uma atresia inicial e/ou moderada. Essa hipótese pode ser embasada em estudos ultra estruturais que mostraram que ovócitos de folículos em atresia inicial, sofrem uma remodelação citoplasmática semelhante ao que ocorre no período de pré-maturação (Hyttell *et al.*, 1997), proporcionando a esses ovócitos uma alta capacidade de desenvolvimento. Efeito benéfico da atresia inicial na aquisição da competência, tem sido demonstrado também, quando ovários são mantidos por algumas horas após o abate, antes da obtenção dos ovócitos, resultando em uma aumento da taxa de blastocisto, por simular o início de atresia (Sirard & Blondin, 1996). Além disso, a análise bi-dimensional das proteínas produzidas nas células do cumulus de folículos pré-ovulatórios e folículos subordinados, em diferentes graus de atresia, mostrou haver uma semelhança marcante entre folículos pré-ovulatório e folículos de 3-8 mm levemente atrético (Dieleman *et al.*, 2002). Esses resultados confirmam que o início de atresia aumenta a competência dos ovócitos, por causar mudanças semelhantes às que ocorrem no período de capacitação. Essa idéia também explicaria o fato de que, alguns ovócitos coletados de folículos grandes continuam incapazes de se desenvolver até blastocisto,

enquanto outros de folículos pequenos em torno de 3 mm são totalmente competentes (Robert *et al.*, 2001).

Modificações do ambiente folicular pela utilização de diferentes protocolos hormonais aumentaram a competência de ovócitos obtidos por OPU (Blondin *et al.*, 1997; Bordinon *et al.*, 1997; Pivato *et al.*, 1999). Esses resultados indicam que o folículo de origem é vital para conferir aos ovócitos o ambiente necessário para adquirir competência para o desenvolvimento, e que a qualidade intrínseca do ovócito no início do processo de PIV, é o fator mais importante em determinar o seu destino final.

Portanto, a competência pode ser adquirida em condições foliculares específicas (Blondin *et al.*, 1997). Sendo assim, Blondin *et al.*, (2002) propôs um tratamento hormonal, em que após a administração de FSH, os animais eram submetidos a um período de *coasting*, ou seja, sem FSH, por 48 horas. Esse protocolo resultou em um aumento da competência, sendo que 80% dos ovócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* se desenvolveram até blastocisto. O período de privação induziu o início da atresia enviando aos ovócitos o sinal apropriado, de forma que quando foram removidos dos folículos estavam competentes. Entretanto, quando um período de *coasting* de 40 horas foi utilizado em sistema comercial de PIV, o aumento da taxa de blastocisto, apesar de satisfatória, não foi significativa (Durocher *et al.*, 2006). Da mesma forma, quando animais de raças diferentes foram utilizados mantendo o período de *coasting* de 48 horas associado (Barros *et al.*, 2006) ou não à administração de LH (Durairaj *et al.*, 2005), nenhuma melhora na taxa de blastocisto foi observada. Esses resultados sugerem que a janela para o *coasting* é pequena e pode variar de acordo com a raça, o período do ciclo em que o FSH é administrado, entre outros fatores. A variação nos resultados, não invalida a hipótese de que os eventos que ocorrem antes da retirada dos ovócitos do ambiente folicular, têm efeito determinante no seu desenvolvimento posterior. Deste modo, o estabelecimento de um modelo, em que se possa simular o ambiente folicular no qual a competência é adquirida, seria muito útil para determinar as mudanças moleculares e celulares que ocorrem nesse período, e com isso proporcionar aos ovócitos condições adequadas para melhorar a eficiência das tecnologias *in vitro*.

Como já mencionado anteriormente, ovócitos competentes necessitam ter estocado fatores importantes, na forma de proteínas e RNAm estável que deverão ser utilizados durante a maturação, fecundação e início do desenvolvimento embrionário (Gandolfi *et al.*, 2005). O papel crítico do ovócito até a MZT, quando o genoma embrionário se torna funcionalmente ativo, pode ser comprovado pelo fato de que, durante esse período, o embrião depende de mecanismos pós-transcricionais para controlar o desenvolvimento. Isso indica que a competência do ovócito, pode estar determinada pela composição e quantidade de transcritos específicos no seu pool de RNAm, que são estocados durante o crescimento e fase final da foliculogênese (Sirard *et al.*, 2001,2006; Lonergan *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2003; Gandolfi *et al.*, 2005).

Para prevenir a degradação de RNAm e proteínas durante a estocagem, mecanismos de pós-transcrição e pós-tradução são essenciais no ovócito (Wang & Kiledjian, 2000). Tem sido demonstrado que a tradução dos RNAm maternos no ovócito, é regulada pela mudança na cauda poli-A, que são seqüências localizadas na região não traduzível do final 3' da molécula do RNAm (Gandolfi & Gandolfi, 2001). Portanto, a poliadenilização representa um fator chave na regulação da expressão gênica, sendo que seu padrão pode ser correlacionado com a capacidade de desenvolvimento. Estudos em bovinos têm demonstrado que ovócitos incompetentes contêm RNAm de alguns genes, com cauda poli-A mais curta (traducionalmente inativas) dos que os totalmente competentes, sendo que essa diferença está presente tanto no estágio de GV como em MII (Brevini-Gandolfi *et al.*, 1999, Lequarre *et al.*, 2004). Da mesma forma, Trenblay *et al.* (2005) mostraram que o RNAm para a ciclina B1, que é um fator importante para a maturação ovocitária, apresentava uma cauda poli-A significativamente mais longa em ovócitos obtidos de

ovários transportados a 35°C do que os de ovários transportados em gelo. Apesar dos autores terem sugerido que o padrão de poliadenilização possa ser utilizado como marcador para competência, cuidados devem ser tomados, visto que mesmo que o ovócito possua RNAm, esses podem não ser efetivamente traduzidos. A falha na tradução pode ser devido a presença de repressores específicos ou mesmo, a uma insuficiência na ativação do próprio maquinário de tradução (Tomek *et al.*, 2002).

Avanços nos Estudos da Maturação e Competência Ovocitária

Um ovócito competente difere de um incompetente por sua capacidade de sustentar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Robert *et al.*, 2001). Essa diferença é o resultado da expressão diferenciada de genes. Se os estoques de RNAm maternos contribuem para a competência, mudanças qualitativas e quantitativas devem existir entre RNAs de ovócitos competentes e incompetentes. Portanto, a variação na expressão gênica permite a identificação e o isolamento de genes associados com o grau de competência do ovócito (Robert *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 2002; Fair *et al.*, 2004), o que forneceria informações valiosas dos mecanismos moleculares envolvidos na maturação ovocitária completa .

Existe um crescente número de informações na literatura com relação à expressão de genes em ovócitos em diversos estágios de desenvolvimento (Robert *et al.*, 2000, 2002; Dalbies-Tran & Mermillod, 2003; Donnison & Pfeffer 2004; Assou *et al.*, 2006). Entretanto, existe também uma falta de informação de como esses genes estão envolvidos nos processos celulares e, como são afetados por mudanças no ambiente do ovócito.

O estudo de genes e de suas funções em ovócitos e embriões tem sido mais lento em relação a outros tipos de células e tecidos. Isto ocorre principalmente, pela limitada disponibilidade de material de ovócito e embriões. Entretanto, nos últimos anos novas técnicas têm surgido possibilitando utilizar quantidade mínimas de material para avaliação da expressão gênica.

Bibliotecas de subtração associadas à técnica de microarranjos são ferramentas muito úteis para selecionar genes candidatos que estão envolvidos em um determinado estágio fisiológico (Sirard *et al.*, 2005). Através da formação de bibliotecas de subtração utilizando duas populações distintas, é possível gerar milhares de clones que são diferencialmente expressos em uma das populações (Diatchenk *et al.*, 1996). E se o resultado dessa biblioteca de subtração for hibridizado em uma lâmina de microarranjos, contendo milhares de seqüências de cDNA ou oligonucleotídeos (Schena *et al.*, 1995), é possível identificar rapidamente uma coleção de genes candidatos, que posteriormente poderão ser seqüenciados e selecionados. Entretanto, a eficiência desse método para identificar candidatos está relacionada com a diferença que existe entre os dois tecidos ou amostras comparadas. Portanto, a confirmação da expressão diferencial deve ser realizada por outros métodos, como por exemplo, o PCR em tempo real (Q-PCR). Embora na maioria dos estudos, os perfis encontrados na análise de microarranjos são confirmados pelo Q-PCR (Donnison & Pfeffer, 2004; Zeng *et al.*, 2004; El-Halawany *et al.*, 2005), alguns estudos não mostram essa mesma relação e, reportam que menos de 30% dos genes selecionado após a hibridização mantém a diferença significativa após a quantificação pelo Q-PCR (Sisco *et al.*, 2003; Fair *et al.*, 2004; Dode *et al.*, 2006).

Esforços para identificar marcadores potenciais para competência em ovócitos bovinos, com o auxílio dessas técnicas, tem sido realizados utilizando ovócitos de diferentes tamanhos de folículos (Robert *et al.* 2000; Donnison & Pfeffer 2004), células do cumulus (Robert *et al.* 2003) e ovócitos que clivam em diferentes momentos após a fecundação (Fair *et al.* 2004; Dode *et al.* 2006). Apesar de alguns genes terem sido identificados como relacionados à competência,

ainda não se tem um consenso sobre que gene ou genes podem ser usados como marcadores. Entretanto, a identificação desses genes que são mais expressos nos ovócitos competentes, sugere que esses, provavelmente, têm um papel importante na competência ovocitária. Estudos posteriores de avaliação funcional desses genes contribuirão para a elucidação dos mecanismos responsáveis pela aquisição dessa competência.

É importante ressaltar, que quando da utilização dessas técnicas, os níveis de RNAm fornecem uma medida de quantidade e que essa pode ser afetada não só pelos níveis de transcrição, mas também pelo processamento e degradação dos transcritos. Além disso, a quantidade de RNAm pode não corresponder aos níveis da proteína, e nem fornece qualquer informação quanto a sua modificação, atividade ou localização. Desta forma, uma análise mais criteriosa deve ser realizada antes de se tirar conclusões sobre o significado funcional dos níveis de RNAm de um gene específico. Somente após a avaliação do conteúdo da proteína correspondente, é que se pode relacionar a quantidade de RNAm ao seu papel funcional no desenvolvimento embrionário.

Considerações Finais

A maturação ovocitária é um processo complexo que envolve a modificação do estado da cromatina do estágio de vesícula germinativa à metáfase II, alterações no citoplasma que levam a mudanças na distribuição e organização de organelas e o acúmulo de instruções moleculares que controlam a progressão nuclear e citoplasmática. Portanto, ovócitos devem conter todas as informações em forma de RNAm estável, que se acumula durante o crescimento e fase final da foliculogênese, para que sejam capazes de maturar, sofrer as primeiras divisões e ativar o genoma embrionário. Essa competência adquirida gradativamente é o que permite que um ovócito tenha capacidade de ter um desenvolvimento embrionário adequado após a fecundação.

Não restam dúvidas de que a competência não se deve a alteração de apenas um gene, mas sim a mudança no nível de expressão de vários genes. E, somente unindo esforços de vários grupos de pesquisas e utilizando técnicas apuradas de identificação e avaliação funcional de genes associados a essa capacidade de desenvolvimento, será possível desvendar os mecanismos responsáveis pela aquisição da competência. A partir desse conhecimento, será possível determinar as condições mais adequadas e reproduzir essas condições *in vitro*, definindo sistemas mais eficientes para a maturação *in vitro*, aumentando a disponibilidade de ovócitos competentes para serem utilizados nas técnicas de reprodução assistida.

Bibliografia

- Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication. *Reproduction* 2003; Supp 61:49-54.
- Ali A, Paradis F, Vigneault C, Sirard MA. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev* 2005; 71:358-67.
- Ali A, Sirard MA. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. *Reproduction* 2005; 130:303-10.

Assou S, Anahory T, Pantesco V, Carroul TL, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, Vos JD, Hamamah S. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. Hum Reprod 2006; [Epub ahead of print].

Baran V, Pavlok A, Bjerregaard B, Wrenzycki C, Hermann D, Philimonenko VV, Lapathitis G, Hozak P, Niemann H, Motlik J. Immunolocalization of upstream binding factor and pocket protein p130 during final stages of bovine oocyte growth. Biol Reprod 2004; 70:877-86.

Barros CM; Ferreira MMG; Eberhardt BG; Melo DS; Monteiro FM; Trinca LA; Potiens JR. Influence of superstimulation protocols, with or without fsh deprivation, on *in vitro* production of nelore embryos (*Bos taurus indicus*). Reprod Fertil Dev 2006; 18:291.

Beker-van Woudenberg AR, van Tol HT, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during *in vitro* maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. Biol Reprod 2004; 70:1465-74.

Bevers MM, Izadyar F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol 2002; 197:173-8.

Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 1995; 41:54-62.

Blondin P, Coenen K, Guibault L, Sirard MA. *In vitro* competence of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. Theriogenology 1997; 47:1061-75.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol Reprod 2002; 66:38-43.

Bordignon V, Norin, N, Durocher J, Bousquet D, Smith LC. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. Theriogenology 1997; 48:291-8.

Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during *in vitro* maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. Mol Reprod Dev 1999; 52:427-33.

Bykov AG, Yding AC, 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.

Cha, KY, Chian, RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. Hum Reprod Update 1998; 4:103-20.

Conti M, Andersen CB, Richard FJ, Shitsukawa K, Tsafiriri A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. Mol Cell Endocrinol 1998; 145: 9-14.

Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. Mol Endocrinol 2006; 20:715-23.

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.

- Dalbies-Tran R, Mermillod P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. Biol Reprod 2003; 68:252-61.
- Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. Reprod Domest Anim 2005; 40:93-7.
- De La Fuente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. Dev Biol 2006; 292:1-12.
- Dekel N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol 2005; 234:19-25.
- Diatchenko L, *et al.* Supression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci 1996; 93:6025-30.
- Dieleman SJ, *et al.* Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. Theriogenology 2002; 57:5-20.
- Dode MAN, Rodovalho NCM, Ueno VG, Alves, RGO. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. Pesq Agropec Bras 2000; 35: 207-17.
- 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.
- Dode MA, Graves C. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. Theriogenology 2002; 57:811-21.
- Dode MAN, Graves CN. Role of estradiol-17beta on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. Anim Reprod Sci 2003; 78:99-110.
- 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.
- 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.
- Durairaj S, Mayes MM, Adans GP, Singh J. Effect of FSH starvation on the developmental competence of bovine oocytes in vitro. Proceedings of the 38th annual meeting of the Society for Study of Reproduction 2005; 299.
- Durocher J, Morin N, Blondin P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. Theriogenology 2006; 65:102-15.
- El-Halawany N, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Tesfaye D, Schellander K. Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction technology. Reprod Fertil Dev 2005; 16: 753-62.
- Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Mol Reprod Dev 1995; 42:437-42.

Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 2003; 78:203-16.

Fair T, Murphy M, Rizos D, Moss C, Martin F, Boland MP, Lonergan P. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 2004; 67:136-44.

Gandolfi TA, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001; 55:1255-76.

Gandolfi F, Brevini TA, 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.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83:431-46.

Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 2000; 53:11-20.

Humblot P, et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63:1149-66.

Hyttell P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47:23-32.

Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 1996; 45:372-7.

Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway. *Biol Reprod* 1997; 57:1484-9.

Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev* 1998a; 49:444-53.

Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1998b; 51:339-45.

Izadyar F, Zhao J, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:398-406.

Joudrey EM, Lechniak D, Petrik J, King WA. Expression of growth hormone and its transcription factor, Pit-1, in early bovine development. *Mol Reprod Dev* 2003; 64:275-83.

Kauffold J, Amer HA, Bergfeld U, Weber W, Sobiraj A. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J Reprod Dev* 2005; 51:325-32.

- Khurana, NK, Niemann. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 2000; 54:741-56.
- Kniijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* 2002; 124:365-75.
- Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol Reprod* 1998; 59:836-42.
- Kolle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 2003; 68:1584-9.
- Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004; 82 E-Suppl:14-23.
- Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J, Donnay I. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. *Biol Reprod* 2004; 71:425-31.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callesen H, Mermillod P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 2005; 63:841-59.
- Livingston T, Eberhardt D, Edwards JL, Godkin J. Retinol improves bovine embryonic development in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 21: 2:83-90.
- 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.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 1996; 54:1420-9.
- 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; 38:259-267.
- Memili E, First NL. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanism of early gene expression as compared with others species. *Zygote* 2000; 8:87-96.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003; 59:651-74.
- Oyamada T, Fukui Y. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev* 2004; 50:107-17.
- Oyamada T, Iwayama H, Fukui Y. Additional effect of epidermal growth factor during in vitro maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. *Zygote* 2004; 12:143-50.

Pant D, Reynolds LP, Luther JS, Borowicz PP, Stenbak TM, Bilski JJ, Weigl RM, Lopes F, Petry K, Johnson ML, Redmer DA, Grazul-Bilska AT. Expression of connexin 43 and gap junctional intercellular communication in the cumulus-oocyte complex in sheep. *Reproduction* 2005; 129:191-200.

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 1992; 31:63-7.

Pivato I, Pereira DC, Peixer MAS, Lucia Jr T, Deschamps JC, Rumpf R. O efeito do bST sobre a taxa de recuperação e qualidade dos ovócitos em bovinos. *Arq Fac Vet UFRGS* 1999; 27:171-86.

Richard FJ, Tsafiri A, Conti M. Role of phosphodiesterase type A3 in rat oocyte maturation. *Biol Reprod* 2001; 65:1444-51.

Rizos D, Lonergan P, Ward F, Duffy P, Boland MP. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:234-48.

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.

Robert C, Gagné D, Bousquet D, Barnes FL, Sirard M. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 2001; 64: 1812-20.

Robert C, McGraw S, Massicotte L, Pravetoni M, Gandolfi F, Sirard MA. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2002; 67:1465-72.

Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 2003; 125:437-46.

Rodriguez KF, Farin CE. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16:55-67.

Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Disruption of gap communication within the ovarian follicles induces oocyte maturation. *Endocrinology* 2006; 146:1236-44.

Shena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270:467-70.

Shi DS, Avery B, Greve T. Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 1998; 50:667-74.

Sirard, MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Scie* 1996; 42:417-26.

Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55:1241-54.

Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, Robert C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod* 2003; Suppl 61:117-29.

Sirard MA, Dufort I, Vallee M, Massicotte L, Gravel C, Reghenas H, Watson AJ, King WA, Robert C. Potential and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA levels in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17:47-57.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006; 65:126-36.

Sisco B, Hagemann LJ, Shelling AN, Pfeffer PL. Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology* 2003; 144:3904-13.

Song JL, Wessel GM. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation* 2005; 73:1-17.

Sutovsky P, Flechon JE, Flechon B, Motlik J, Peynot N, Chesne P, Heyman Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol Reprod* 1993; 49:1277-87.

Takagi M, *et al.* Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction* 2001; 121: 941-51.

Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* 2004; 70:548-56.

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 Dom Anim* 2002; 37:86-91.

Tremblay K, Vigneault C, McGraw S, Sirard MA. Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. *Biol Reprod* 2005; 72:1037-44.

Van de Leemput EE, *et al.* Improvement of in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers treated for superovulation with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* 1999; 52: 335-49.

Vanderhyden BC, Macdonald EA, Nagyova E, Dhawan A. Evaluation of members of the TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reprod Suppl.* 2003; 61:55-70.

Viuff D, Avery B, Greve T, King WA, Hyttel P. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 1996; 43:171-9.

Vozzi, C, Formenton, A, Chanson, A, Sahli, R, Shaw, P, Nicod, P, Germond, M, Haefliger, JA. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction* 2001; 122:619-628.

Wang Z, Kiledjian M. The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Mol Cell Biol* 2000; 20:6334-41.

Wang C, Xie H, Song X, Ning G, Yan J, Chen X, Xu B, Ouyang H, Xia G. Lanosterol 14 α -demethylase expression in the mouse ovary and its participation in cumulus-enclosed oocyte spontaneous meiotic maturation in vitro. *Theriogenology* 2006; [Epub ahead of print].

Wassarman PM, Albertini DF. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neil, J.D. (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press;1994.

Watson AJ, **De Sousa P**, **Caveney A**, **Barcroft LC**, **Natale D**, **Urquhart J**, **Westhusin ME**. Impact of Bovine Oocyte Maturation Media on Oocyte Transcript Levels, Blastocyst Development, Cell Number, and Apoptosis. *Biol Reprod* 2000; 62: 355-64.

Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in cAMP and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol* 2002; 246:441-54.

Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 2004; 272:483-96