

Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento

Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: acquisition of competence for development

Elisa Melo *Ferreira*¹; Alessandra Aparecida *Vireque*¹; Paulo Roberto *Adona*²; Flávio Vieira *Meirelles*²; Rui Alberto *Ferriani*¹; Paula Andrea de Albuquerque Salles *Navarro*^{1,3}

¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, FMRP/USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

²Departamento de Ciências Básicas, FZEA/USP, Pirassununga, SP, Brasil.

³Correspondência: paasnavarro@uol.com.br

A maturação nuclear do oócito bovino refere-se à segregação cromossômica. A maturação citoplasmática pode ser subdividida, didaticamente, em: 1) Redistribuição das organelas; 2) Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto; e 3) Maturação molecular. Os filamentos do citoesqueleto movimentam as organelas citoplasmáticas e também atuam na segregação cromossômica. A poliadenilação é o principal mecanismo de início de tradução de proteínas que atua sobre o mRNA materno estocado durante a maturação molecular. Inúmeras proteínas e moléculas marcadoras de maturação citoplasmática são transcritas durante esse estágio. Diversas modificações ocorrem no citoplasma do oócito bovino durante a aquisição de competência meiótica para o desenvolvimento.

Palavras-chave: maturação citoplasmática, oócitos bovinos, organelas, citoesqueleto.

Abstract

Nuclear maturation of bovine oocytes involves chromosomal segregation. Cytoplasmic maturation can be subdivided, didactically, into: 1) Organelle redistribution, 2) Filaments of the cytoskeleton dynamics, and 3) Molecular maturation. The filaments of the cytoskeleton promote the movements of the organelles and act on chromosome segregation. Polyadenylation is the main mechanism that initiates protein transduction and acts on the stored maternal mRNA during molecular maturation. Innumerable proteins and markers of cytoplasmic maturation are transcribed during this stage. Several modifications occur in bovine oocyte cytoplasm during the acquisition of meiotic competence for development.

Keywords: cytoplasmic maturation, bovine oocytes, organelles, cytoskeleton.

Introdução

A complexidade dos eventos que ocorrem durante a maturação do oócito depende não só da correta dinâmica de separação dos cromossomos na maturação nuclear, mas também da redistribuição das organelas citoplasmáticas e do acúmulo de mRNA, proteínas e fatores de transcrição, necessários para que o processo se realize.

O estoque de transcritos e proteínas no citoplasma do oócito é de fundamental importância para o processo de maturação e, principalmente, para assegurar o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de oito células (bovinos), quando o genoma embrionário é ativado, e a síntese de novas proteínas torna-se necessária. Essa fase é denominada transição materno-zigótica (MZT, do inglês maternal zygotic transition) e a expressão de certos genes durante esse período determinará o sucesso da embriogênese no estágio de pré-implantação (Meirelles *et al.*, 2004).

Apesar de serem processos distintos, a maturação nuclear e a maturação citoplasmática são eventos interligados e que ocorrem de modo simultâneo em determinados momentos, embora a programação molecular do citoplasma tenha início ainda na fase de crescimento do oócito (Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001). Pode-se, contudo, subdividir o processo de maturação citoplasmática em três eventos principais: 1) redistribuição das organelas citoplasmáticas; 2) dinâmica dos filamentos do citoesqueleto; e 3) maturação molecular (Ferreira *et al.*, 2009).

Portanto, o objetivo dessa revisão é focar o processo de maturação citoplasmática, tendo em vista as modificações que ocorrem nesse compartimento durante a aquisição de competência meiótica para o desenvolvimento.

Redistribuição das organelas citoplasmáticas

Já está bem estabelecido que, durante a maturação oocitária, inúmeras modificações ultraestruturais podem ser observadas nas organelas citoplasmáticas, tanto no que se refere à morfologia quanto à redistribuição. O tráfego

das organelas citoplasmáticas durante a maturação é feito via citoesqueleto, através dos microfilamentos e microtúbulos, e seu reposicionamento depende das necessidades da célula em cada estágio de desenvolvimento.

Mitocôndrias

A ativação de determinadas vias metabólicas, envolvidas na síntese e na fosforilação de proteínas, é indispensável para a maturação do citoplasma. Nesse contexto, a mitocôndria tem um papel de extrema importância, já que é um componente-chave da maquinaria metabólica, responsável por fornecer a energia a ser consumida no processo de maturação (Krisher e Bavister, 1998; Stojkovic, 2001). O movimento de mitocôndrias para áreas de grande consumo de energia é crucial para o oócito e para os blastômeros do embrião durante períodos críticos do ciclo celular. De acordo com estudos prévios, durante a maturação, as mitocôndrias sintetizam o ATP necessário para a síntese de proteínas que darão suporte à conclusão dos processos de maturação e desenvolvimento embrionário subsequente (Krisher e Bavister, 1998; Stojkovic, 2001).

Análises da ultraestrutura de oócitos maturados *in vitro* (MIV) mostraram que as mitocôndrias se movimentam de uma posição mais periférica, para uma distribuição mais espacial após 12-18 horas de cultura (Hyttel *et al.*, 1986). Este padrão é bem semelhante ao que foi observado *in vivo*, em que se notou uma distribuição mais periférica antes do pico do hormônio luteinizante (LH), uma formação cortical agrupada, semelhante a *clusters*, nos estádios finais da maturação nuclear e uma dispersão após a extrusão do corpúsculo polar, aproximadamente 19 horas após o pico de LH (Kruip *et al.*, 1983; Hyttel *et al.*, 1997). Quando o oócito atinge o estágio de metáfase II (MII), as mitocôndrias, juntamente com gotas lipídicas, assumem uma posição central na célula (Hyttel *et al.*, 1997; ver Fig. 1-A). Em adição, estudos recentes mostram que o número de mitocôndrias presentes no citoplasma do oócito varia de acordo com o estágio de desenvolvimento em que este se encontra. Oócitos primários contêm aproximadamente 6.000 mitocôndrias, e esse número aumenta para mais de 100.000, durante a maturação citoplasmática (Trimarchi *et al.*, 2000; Cummins, 2004; Tarazona *et al.*, 2006).

Estudos recentes confirmam a correlação entre a reorganização das mitocôndrias nos oócitos após a maturação *in vitro*, os níveis de ATP e o número total de células nos blastocistos. Embriões com menor quantidade de ATP no citoplasma mostraram um desenvolvimento mais lento, resultando em um menor número de células (Liu *et al.*, 2000; Stojkovic *et al.*, 2001). Também foi observado que, antes da ativação do genoma embrionário (aproximadamente 72h de cultivo), as mitocôndrias apresentam níveis intermediários de atividade, o que pode ser explicado pela proteção adaptativa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS, reactive oxygen species), resultantes do metabolismo mitocondrial (Nohl *et al.*, 2005; Tarazona *et al.*, 2006). Essa proteção é feita por moléculas *scavengers* como a glutatona e as peroxidases, produzidas durante a maturação molecular do oócito ou por transcrição permissiva no estágio embrionário de duas células (Lonergan *et al.*, 2000). Assim, se houvesse uma alta atividade mitocondrial durante os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário, os embriões provavelmente não sobreviveriam, por não conseguirem eliminar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio em tais processos (Tarazona *et al.*, 2006). Após o início da transcrição do genoma embrionário, a atividade mitocondrial diminui à medida que o embrião passa a utilizar outras vias metabólicas, como a glicólise anaeróbia, para produzir energia (Eckert *et al.*, 1998; Tarazona *et al.*, 2006).

Em blastocistos eclodidos, a distribuição das mitocôndrias nos blastômeros passa de perinuclear para pericitoplasmática, enquanto nas células da massa celular interna essa distribuição não se altera. Tal fato pode ser explicado pelo início da expressão de proteínas de adesão pelas células trofoblásticas (Lu *et al.*, 2002) que, ao se prepararem para o reconhecimento materno e a adesão na implantação, consomem mais moléculas de ATP nas proximidades da membrana plasmática do que as células do embrioblasto (Tarazona *et al.*, 2006).

Ribossomos

A síntese de proteínas é indispensável não apenas para a progressão da maturação no oócito *per se*, mas também para a formação do zigoto e embriogênese inicial. Para isso, é necessário que uma quantidade adequada de ribossomos esteja presente durante a maturação. Os ribossomos são sintetizados pela transcrição de genes de rRNA (ribossomal RNA), pelo processamento dos transcritos e pela adição de inúmeras proteínas ribossomais às suas duas subunidades. O nucléolo é o sítio de formação das subunidades dos ribossomos e, durante a fase de crescimento oocitário e ativação do genoma embrionário, se apresenta na forma fibrilo-granular, o que reflete a alta atividade de síntese de ribossomos e, consequentemente, a síntese proteica. O oócito de um folículo primordial está transcricionalmente quiescente, e o nucléolo é composto exclusivamente pela porção granular, sinalizando a ausência de atividade de síntese de ribossomos (Fair *et al.*, 2001; Hyttel *et al.*, 2001). Durante a meiose, no estágio de metáfase I, há aproximadamente três vezes mais síntese de proteínas no oócito do que no estágio de GVBD (do inglês, *germinal vesicle breakdown*; Fig. 1-A). Ao alcançar o estágio de metáfase II, no entanto, o oócito exibe níveis basais de tradução de proteínas. Tal fato poderia ser explicado pela ausência de um nucléolo funcional, uma vez que a cromatina está condensada em forma de cromossomos e, assim, não haveria a transcrição de rRNA e a consequente produção de ribossomos para a tradução do mRNA (Tomek *et al.*, 2002). Tais evidências corroboram a ideia de que a presença dos ribossomos está diretamente ligada à síntese proteica

nos períodos cruciais do desenvolvimento.

Retículo Endoplasmático (RE)

As membranas do retículo endoplasmático são fisiologicamente ativas, interagem com o citoesqueleto e contêm diferentes domínios especializados em funções distintas. Dentre as funções do retículo endoplasmático descritas, destacam-se o enovelamento de proteínas e sua degradação, o metabolismo de lipídeos, a compartimentalização do núcleo, a regulação do gradiente de íons Ca^{2+} e a síntese de membranas (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2000). Esse sistema tem um papel de extrema importância na sinalização intracelular, por armazenar e liberar o cálcio.

Modificações bioquímicas e estruturais no retículo endoplasmático durante a maturação são pontos cruciais para o funcionamento do sistema de regulação do cálcio intracelular. Em análises *in vivo* de oócitos de camundongos no estágio de vesícula germinativa (VG), o retículo endoplasmático apresenta-se uniformemente distribuído no ooplasma. Ao progredir o desenvolvimento até o estágio de metáfase II, observou-se que o retículo endoplasmático se apresenta em regiões corticais e acumula-se em pequenas porções de 1-2 μ m de largura (*clusters*) por todo o citoplasma, exceto nas proximidades do aparato meiótico (Kline, 2000; Stricker, 2006; Fig. 1-A). A sensibilidade do sistema de liberação de cálcio torna-se aumentada após a maturação. Durante a fertilização, a entrada do espermatozoide no oócito leva a uma acentuada liberação de cálcio do retículo, que ativa o início do desenvolvimento (Kline, 2000) (Fig. 1-B). Sendo assim, no momento de formação do segundo corpúsculo polar, aproximadamente 3-4 h após a inseminação e 2 h antes de cessar a sinalização de cálcio no estágio pronuclear do desenvolvimento, os *clusters* do retículo endoplasmático se desagregam (Jones *et al.*, 1995; Stricker, 2006).

Grânulos corticais

Os grânulos corticais são derivados do complexo de Golgi (Wessel *et al.*, 2001) e sua exocitose envolve membros da hipótese SNARE de tráfico intracelular (Conner *et al.*, 1997) e filamentos do citoesqueleto (Wessel *et al.*, 2002). Sabe-se que em oócitos no estágio de vesícula germinativa, os grânulos corticais apresentam-se distribuídos em *clusters* pelo citoplasma (Hosoe e Shioya, 1997) e, ao final do período de maturação, quando esses oócitos atingem o estágio de metáfase II, os grânulos encontram-se distribuídos por toda a superfície interna, próximos à membrana plasmática (Thibault *et al.*, 1987; Wessel *et al.*, 2001), estrategicamente dispostos, à espera da ativação (Fig. 1-A).

Os grânulos corticais são organelas exclusivas dos oócitos, e sua composição inclui uma diversa população de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanas. A exocitose dos grânulos corticais apresentada pelo oócito é um dos mecanismos mais comuns para a prevenção da polispermia (Hosoe e Shioya, 1997). Se houver fertilização por mais de um espermatozoide, o zigoto resultante sofrerá clivagens anormais e se tornará inviável, morrendo ainda no início das divisões mitóticas. O mecanismo de bloqueio é altamente conservado entre os grupos animais e se baseia na rápida modificação da matriz extracelular oocitária, pela liberação do conteúdo dos grânulos corticais na superfície externa, após a ativação do oócito pela entrada do espermatozoide (Haley e Wessel, 2004; Fig. 1-B).

Complexo de Golgi

A dinâmica das membranas do Golgi durante a maturação e a fertilização nos mamíferos é um evento que ainda necessita de mais informações para ser completamente compreendido (Payne e Schatten, 2003). Sabe-se que oócitos bovinos, no estágio de vesícula germinativa, apresentam fragmentos de Golgi que se transformam em vesículas durante a GVBD (Hyttel *et al.*, 1986; Moreno *et al.*, 2002; Payne e Schatten, 2003).

Apesar dos achados até o momento, os dados da literatura com relação ao papel exercido pelo complexo de Golgi na maturação e eventos subsequentes permanecem conflitantes. Um estudo recente mostrou que, ao contrário do que ocorre em células somáticas, nas células germinativas em metáfase II, proteínas da matriz extracelular, como a GM130 encontrada nas membranas do complexo de Golgi, são fosforiladas e se co-localizam apenas com os sítios de exportação do retículo endoplasmático e não com o fuso meiótico, o que sugere que o mecanismo de organização do complexo de Golgi é independente do centróssomo. Tal diferença pode ser explicada pelo fato de que na mitose, há uma partição uniforme das proteínas e membranas do Golgi entre as duas células-filhas, o que não ocorre nos oócitos, pela formação do primeiro e segundo corpúsculos polares. Além disso, o estudo mostrou que, ao contrário do que foi observado em embriões de camundongos e *C. elegans*, nem a fertilização, nem a divisão celular até o estágio de oito células necessitam do tráfico através da via secretória, já que os zigotos bovinos cultivados na presença de Brefeldina A (BFA), um metabólito fúngico que inibe a secreção de proteínas por interromper o transporte de vesículas RE-Golgi, completaram a citocinese e se dividiram até o estágio de oito células. Uma hipótese levantada para explicar tal fato, no entanto, foi a de que a dose de Brefeldina A utilizada tenha sido baixa e, por isso, insuficiente para inibir a secreção (Payne e

Schatten, 2003). Portanto, novos estudos devem ser conduzidos no sentido de preencher as lacunas existentes entre a dinâmica das proteínas e membranas do Golgi e sua importância direta tanto na maturação do oócito, quanto na fertilização e embriogênese inicial (Moreno *et al.*, 2002).

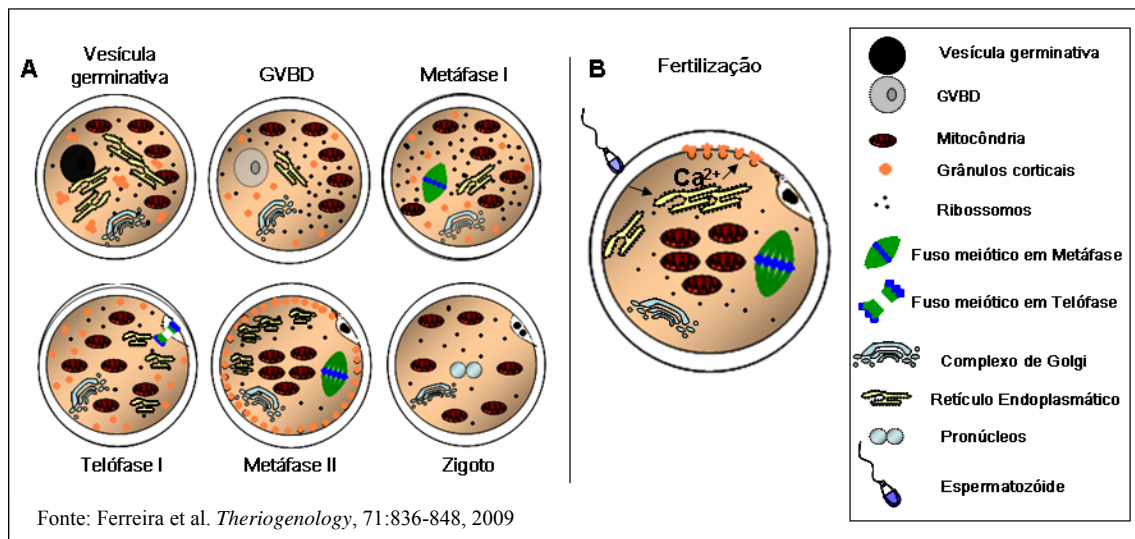


Figura 1. Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino. **A.** Progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas, desde o estágio imaturo de vesícula germinativa até a maturidade plena, em metáfase II, e estágio de formação do zigoto; **B.** Distribuição das organelas e o mecanismo de liberação do conteúdo dos grânulos corticais, secundário à liberação do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, engatilhado pela penetração do espermatozóide, na fertilização.

Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a maturação

Os filamentos do citoesqueleto são estruturas dinâmicas e adaptáveis, que podem se manter ou sofrer alterações, de acordo com as necessidades da célula. Além disso, esse sistema é responsável pela segregação dos cromossomos na meiose e mitose, pela divisão celular na citocinese e pelo direcionamento e trânsito de moléculas e organelas no interior das células (Alberts *et al.*, 2004). Os três tipos de filamentos do citoesqueleto são formados por subunidades características de cada um. Os microtúbulos (MT) são formados por subunidades globulares e compactadas de tubulina e os filamentos de actina, pelas subunidades também globulares e compactadas de actina. Os filamentos intermediários são formados por subunidades polipeptídicas alongadas e fibrosas, que se arranjam em um tetrâmero, análogo às subunidades de $\alpha\beta$ -tubulina nos microtúbulos e ao monômero de actina. Sua função relaciona-se, principalmente, à resistência mecânica em resposta ao estresse. Estes três tipos de “polímeros” do citoesqueleto são mantidos por fracas interações não-covalentes, podendo se associar e dissociar rapidamente, sem a necessidade de formação ou quebra de ligações covalentes (Alberts *et al.*, 2004).

Durante o período de crescimento dos oócitos, no estágio de vesícula germinativa, o rearranjo espacial das organelas se deve à modificação da organização do citoesqueleto, que forma uma rede onde as organelas delimitadas por membranas se movimentam e assumem posições definidas (Albertini, 1992; Fig. 2). Ao entrar na fase M do ciclo celular (meiose, no caso dos gametas femininos), oócitos bovinos mostram que, após a GVBD, ásters de microtúbulos aparecem próximos à cromatina condensada e durante a transição do estágio de vesícula germinativa até anáfase I, os microfilamentos ou filamentos de actina distribuem-se na área cortical, abaixo do oolema, sem se conectarem com os microtúbulos (Li *et al.*, 2005; Fig. 2). No estágio de metáfase I (MI), os microtúbulos são nucleados pela polimerização da tubulina, a partir dos centrossomos ou centros organizadores de microtúbulos (COMs), no citoplasma do oócito, formando o fuso meiótico e a placa metafásica, onde os cromossomos estão dispostos equatorialmente (Albertini, 1992; Alberts *et al.*, 2004; Fan e Sun, 2004; Fig. 2-A). A placa metafásica em metáfase I é proporcionalmente maior do que a que é formada em metáfase II e, nessa fase, os filamentos de actina estão fortemente distribuídos na região cortical e ausentes entre os microtúbulos (Fig. 2). O fuso tem uma forma de barril e seus polos são achatados (Li *et al.*, 2005).

Ao atingir o estágio de anáfase I, os cromossomos começam a ser separados e, portanto, uma grande porção de microtúbulos pode ser vista entre os dois conjuntos cromossômicos em segregação. O fuso se alonga e uma grande quantidade de filamentos de actina passa a ser observada ao redor dos cromossomos (Fig. 2). No estágio de telófase I (TI), os microtúbulos que estão entre os conjuntos cromossômicos formam uma estrutura triangular semelhante a cones que têm uma porção mais larga e outra porção mais fina (Fig. 2-B). A porção mais

larga de microtúbulos está ligada ao conjunto cromossômico destinado à extrusão, constituindo, assim, o primeiro corpúsculo polar (CP). A porção mais fina encontra-se associada ao conjunto que irá permanecer no oócito e entrar na meiose II, formando novamente a placa metafásica. Portanto, durante a meiose oocitária, esse sistema estrutural do citoesqueleto tem ainda um papel fundamental: garantir que quase todo o citoplasma da célula em divisão permaneça no oócito secundário, já que este acumulou toda a informação necessária para a progressão das etapas subsequentes, e eliminar apenas uma pequena porção citoplasmática, no momento da extrusão dos corpúsculos polares. Sendo assim, os filamentos de actina associados aos cromossomos também são eliminados no momento da extrusão (Li *et al.*, 2005).

Entre a transição do estágio de telófase I para metáfase II, não há um novo período de intérfase, apenas uma rápida condensação da cromatina e desaparecimento dos microfilamentos e dos microtúbulos do fuso meiótico, referida como intercinese (Fan e Sun, 2004). A placa metafásica reaparece logo em seguida. O aparato meiótico em metáfase II é menor do que o observado em metáfase I, o que poderia ser explicado pela redução do número de cromossomos que, agora, correspondem à metade do número inicial (Li *et al.*, 2005; Fig. 2).

Portanto, além do que foi descrito anteriormente a respeito da movimentação das organelas citoplasmáticas, os filamentos do citoesqueleto ainda participam ativamente da capacitação do oócito, em função da aquisição de competência do material nuclear para a progressão do desenvolvimento.

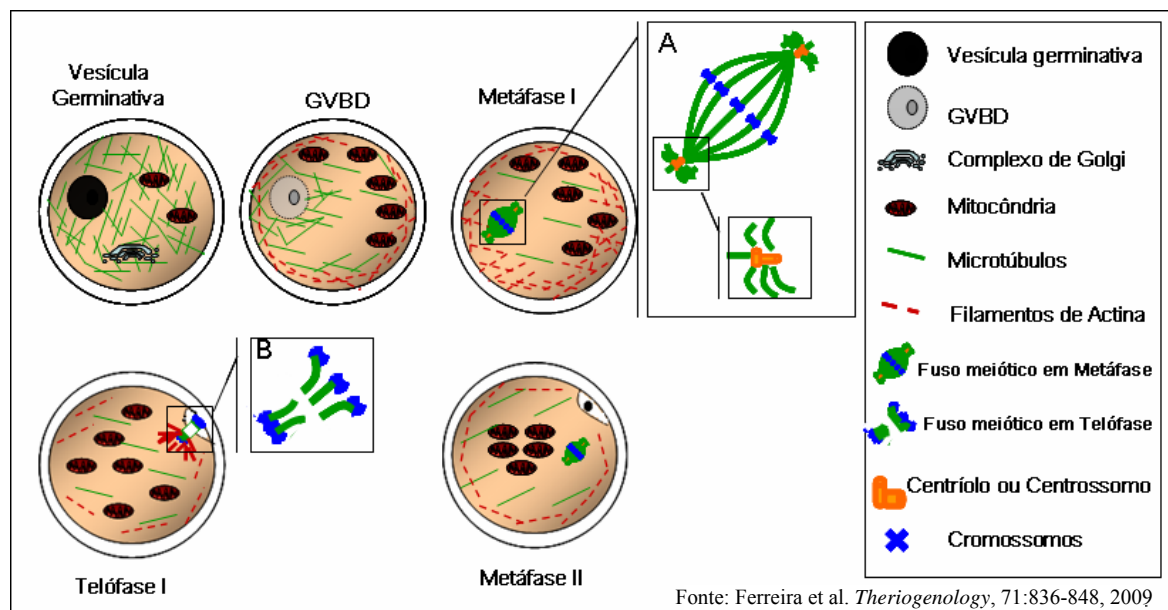


Figura 2. Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bovinos. **A)** Detalhe do fuso meiótico em metáfase I e a estrutura do centríolo/centrossomo **B)** Detalhe do fuso meiótico em telófase I, em que podemos ver os microtúbulos entre os conjuntos cromossômicos.

Maturação molecular

A maturação molecular corresponde às fases de crescimento e maturação do oócito e é assim definida por se tratar da transcrição, armazenamento e processamento dos mRNAs expressos pelos cromossomos, que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos. As proteínas derivadas desses mRNAs estão envolvidas tanto na maturação, quanto nos eventos celulares subsequentes: fertilização, formação de pronúcleos e embriogênese inicial, devendo, portanto, ser estocadas até sua utilização (Sirard, 2001).

Como grande parte dos transcritos será consumida previamente à ativação do genoma embrionário, seu correto armazenamento no citoplasma do oócito torna-se fundamental, uma vez que, após a retomada da meiose, não há mais expressão gênica (Sirard, 2001) e, portanto, tudo o que foi produzido durante a fase de crescimento deverá ser metabolizado no momento adequado.

O mRNA transcrito durante a maturação molecular do oócito é acumulado em uma forma estável, porém transitoriamente inativa (Sirard, 2001; Tomek *et al.*, 2002). A maquinaria biossintética do citoplasma processa esse mRNA em partículas ribonucleoproteínicas (Davidson, 1986) e, nessa forma “empacotada”, ele é protegido da degradação nucleolítica e permanece estocado até o recrutamento para a tradução em sinais específicos gerados tanto na maturação quanto no desenvolvimento embrionário inicial (Fulka Jr. *et al.*, 1998). As maiores causas de falha na maturação oocitária são o armazenamento, processamento e recrutamento inapropriado do mRNA materno (Brevini Gandolfi *et al.*, 1997).

Poliadenilação

Inúmeros mecanismos estão envolvidos na ativação do mRNA traducionalmente inativo (Brown e Schreiber, 1996; Tomek *et al.*, 2002). Tais mecanismos incluem a fosforilação de inúmeros fatores que iniciam a tradução, como o eIF-4F (Thach, 1992), a fosforilação da proteína S6 da subunidade ribossomal 40S (Gavin e Schorderet-Slatkine, 1997; Fan e Sun, 2004) e a desfosforilação da poli(A)-polimerase (Colgan *et al.*, 1996). De acordo com esse modelo, a poliadenilação (adição de adenina) na porção 3' terminal do mRNA citoplasmático estimularia a liberação de moléculas repressoras ligadas à porção 5' (Meric *et al.*, 1996; Tomek *et al.*, 2002) e, com isso, iniciaria a tradução. Esse processo de poliadenilação é iniciado no núcleo e são adicionados 250 a 300 resíduos de adenina (A) ao mRNA para a formação da cauda poli-(A)-3'. O transporte desse mRNA para o citoplasma é feito por meio de um encurtamento característico da cauda poli-(A); *splicing*) que, ao alcançar tal compartimento, torna-se menor e heterogêneo no tamanho (Jackson e Standart, 1990; Tomek *et al.*, 2002). Sabe-se que quando as moléculas de mRNA possuem caudas poli-(A) curtas, elas não são efetivamente traduzidas (Curtis *et al.*, 1995) e a deleção dessa sequência é um passo inicial do processo de degradação (Couttet *et al.*, 1997; Tomek *et al.*, 2002). O prolongamento citoplasmático da cauda poli-(A), no entanto, está relacionado à ativação da tradução (Shim *et al.*, 1997), isto é, a adição de adenina ao mRNA, no citoplasma do oócito durante a maturação, leva à tradução das proteínas, e a deadenilação, por sua vez, leva à degradação desse mRNA.

Os principais transcritos produzidos durante a maturação molecular dos complexos cumulus-oócito (COCs, cumulus-oocyte complexes) são, entre outros, os reguladores do ciclo celular: fator promotor de maturação (MPF, maturation promoting factor) e suas subunidades formadoras ciclina B e a p34^{cdc2}; a proteína do pro-oncogene *c-mos*, MOS; e a proteína *kinase* ativada por mitógeno (MAPK), além de inúmeros outros mRNAs, que serão descritos posteriormente (Calder *et al.*, 2003); as proteínas e moléculas marcadoras de maturação citoplasmática, como a glutatona (Ali *et al.*, 2003) e moléculas de ATP (Stojkovic *et al.*, 2001); e os componentes do sistema enzimático antioxidante catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase (Cetica *et al.*, 2001).

Reguladores do ciclo celular

Sabe-se que um evento preliminar à retomada da meiose em oócitos bovinos é a síntese de novas proteínas (Levesque e Sirard, 1996; Tremblay *et al.*, 2005). A maioria das proteínas e fatores envolvidos nesse processo é sintetizada nas primeiras horas de cultivo *in vitro*, sendo o fator promotor de maturação responsável pelo início da retomada da meiose (Tremblay *et al.*, 2005). O fator promotor de maturação é um heterodímero formado pelas subunidades regulatória ciclina B1 e catalítica p34^{cdc2} (Jones, 2004). Em oócitos bovinos no estágio de vesícula germinal, provenientes de ovários recuperados em abatedouro, são detectados estoques maternos do mRNA de ciclina B1, porém, não há ainda presença da proteína. Sabe-se que o mRNA de ciclina B1 é estocado com uma cauda poli-(A) curta, em uma forma traducionalmente inativa, e o acúmulo desse transcrito leva a uma grande poliadenilação citoplasmática. Dessa forma, tem início a tradução e a síntese da proteína ciclina B1, sendo esta acumulada e detectada no citoplasma do oócito 3h após o início da maturação *in vitro* (Levesque e Sirard, 1996; Tremblay *et al.*, 2005). Estudos em oócitos de *Xenopus laevis* e em células somáticas humanas cultivadas *in vitro* revelaram que o mRNA da proteína *kinase* p34^{cdc2} ou Cdk1 também sofre um alongamento da cauda poli-(A) por poliadenilação, em um processo que envolve a fosforilação da proteína ligada ao elemento de poliadenilação citoplasmática (CPEB, cytoplasmic polyadenylation element-binding protein) pela ação da *kinase* mitótica Aurora-A. A proteína ligada ao elemento de poliadenilação citoplasmática está ligada de maneira repressora a uma sequência específica de RNA (UUUUUAU), o elemento de poliadenilação citoplasmática (CPE, cytoplasmic polyadenylation element), localizado na região 3' não traduzida dos mRNAs, consistindo em um sítio de reconhecimento do mRNA para o início da poliadenilação. Assim, a via de fosforilação Aurora-A-CPEB leva ao início da poliadenilação e, conseqüentemente, à tradução da p34^{cdc2} (Stebbins-Boaz *et al.*, 1996; Mendez e Richter, 2001; Sasayama *et al.*, 2005). Após a tradução, a proteína p34^{cdc2} une-se à ciclina B1, e esse complexo é, então, fosforilado pelas *kinases* Wee1/Myt1 e, assim, é formado o chamado pré-fator promotor de maturação que, após sofrer desfosforilação pela fosfatase cdc25, é ativado e passa a ter a atividade funcional de fator promotor de maturação propriamente dito (Jones, 2004).

A proteína MOS, produto do proto-oncogene *c-MOS*, é codificada também por um mRNA materno, estocado durante o crescimento do oócito. Durante o período de maturação, esse mRNA é traduzido e degradado, juntamente com outros mRNAs em fases posteriores do desenvolvimento, de acordo com a espécie estudada. A proteína MOS ativa a cascata da proteína *kinase* ativada por mitógeno, que modula a atividade do fator promotor de maturação e leva à entrada no ciclo celular (transição da fase G2 para a fase M; Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001). Em complexos cumulus-oócito bovinos, a poliadenilação de mRNAs que codificam proteínas necessárias para ativação do fator promotor de maturação e da proteína *kinase* ativada por mitógeno ocorre entre 9h e 12h de cultivo *in vitro* (Krischek e Meinecke, 2002; Rodriguez e Farin, 2004). Assim, a síntese e o armazenamento apropriados desses transcritos no citoplasma do oócito serão cruciais também para a continuidade dos eventos nucleares de retomada e progressão da meiose.

Outros mRNAs envolvidos na aquisição de competência para o desenvolvimento

Outros transcritos codificados durante a maturação dos complexos cumulus-oócito somam-se aos aqui listados em função do equilíbrio e da coordenação dos eventos celulares envolvidos na aquisição de competência como um todo. As gonadotropinas têm um papel primordial de coordenação fisiológica e, por isso, mRNAs que codificam receptores de FSH, LH (FSHr e LHr) e conexina 43 (Cx 43r) também devem ser transcritos pelo complexo cumulus-oócito para que, quando adicionados *in vitro*, os hormônios possam agir durante a maturação oocitária. As conexinas são proteínas transmembrana que formam as junções gap, responsáveis pela comunicação entre o oócito e as células do cumulus circundantes (Calder *et al.*, 2003). A conexina 43 (Cx43), em particular, está envolvida no crescimento folicular e seu mRNA e proteína estão presentes durante a maturação de complexos cumulus-oócito bovinos (Modina *et al.*, 2001). Os mRNAs de FSHr, LHr e Cx43 poderiam ser considerados preditores de competência oocitária *in vitro*, por exercerem funções tão importantes na sinalização celular e foliculogênese. Estudos recentes mostram que os níveis mRNAs que codificam tais proteínas dependem do tempo de maturação e da qualidade do oócito (Calder *et al.*, 2005).

Marcadores de maturação citoplasmática e sistema enzimático antioxidante

Além dos reguladores do ciclo celular, outras moléculas fundamentais para desenvolvimento e progressão da maturação e embriogênese inicial são sintetizadas e acumuladas no interior do oócito, sendo sua presença considerada um marcador da aquisição de competência citoplasmática para suportar as fases seguintes. Nesse contexto, a glutatona tem sido um dos mais investigados marcadores de maturação citoplasmática. Vários estudos mostram que essa enzima tem um papel fundamental na proteção das células contra danos oxidativos (De Matos e Furnus, 2000), através da eliminação das espécies reativas de oxigênio produzidas durante o metabolismo mitocondrial, como mencionado anteriormente. Seus níveis de concentração intracelular aumentam à medida que o oócito prossegue seu desenvolvimento do estágio de vesícula germinativa até metáfase II (Miyamura *et al.*, 1995; Ali *et al.*, 2003). Após a fertilização, a atividade enzimática da glutatona relaciona-se à descondensação da cromatina espermática, com consequente ativação do oócito e, também, à transformação da cabeça do espermatozoide em pronúcleo masculino (De Matos e Furnus, 2000). A síntese dessa enzima durante a maturação *in vitro* parece depender da disponibilidade de cisteína no meio de cultura (Furnus e De Matos, 1999). Assim, se o meio utilizado na maturação *in vitro* for deficiente nesse precursor, a síntese de glutatona será afetada por insuficiência de substrato, e os oócitos serão cultivados em condições subótimas, resultando em um desenvolvimento embrionário insatisfatório (De Matos e Furnus, 2000; Ali *et al.*, 2003). Além da glutatona, moléculas de ATP também têm sido utilizadas como marcadores de maturação citoplasmática (Stojkovic *et al.*, 2001; Herrick *et al.*, 2003). Estudos recentes mostram que a quantidade de moléculas de ATP em oócitos morfológicamente competentes (categorias 1-3) aumenta de 1.4-1.8 pmol antes da maturação *in vitro* para 2.3-2.5 pmol após a maturação, com reflexo positivo também no desenvolvimento embrionário inicial (Stojkovic *et al.*, 2001).

Juntamente com a glutatona, outras moléculas do sistema enzimático antioxidante têm um importante papel atenuante dos efeitos deletérios do estresse oxidativo provocado pelas espécies reativas de oxigênio (Cetica *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase estão presentes em oócitos bovinos e células do cumulus após a maturação *in vitro*. Em adição, seus níveis em oócitos desnudos são menores do que aqueles observados em complexos cumulus-oócito, embora não tenha sido detectada diferença entre os dois grupos em relação à produção de espécies reativas de oxigênio ($P > 0,05$; Cetica *et al.*, 2001).

As modificações estruturais e bioquímicas aqui descritas quanto à redistribuição das organelas, à dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular têm início ainda na fase de crescimento e se completam com a progressão do desenvolvimento, como consequência direta da maturação citoplasmática do oócito. Tais modificações refletem a amplitude da organização e programação celular altamente conservadas evolutivamente não só nos mamíferos, mas também em vertebrados de posição inferior na escala evolutiva e invertebrados, refletindo, assim, o gasto de energia empregado pelo gameta feminino em assegurar a perpetuação das espécies. Portanto, o processo de maturação citoplasmática deve ser interpretado como uma capacitação gradual que, juntamente com a competência meiótica nuclear, descreve mecanismos-chave que compõem a fascinante biologia do oócito.

Referências

- Albertini DF.** Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mut Res*, v.296, p.57-68, 1992.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.1044-1045.
- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA.** Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro*

- maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, v.59, p.939-949, 2003.
- Brevini-Gandolfi TA, Cillo S, Modine S, Gandolfi F.** Deffective developmental capacity of bovine oocytes is accompanied by a shorter poly(A) tail of maternal transcripts. *J Reprod Fertil Abstr Ser*, n.19, p.41-42, 1997.
- Brevini-Gandolfi TA, Gandolfi F.** The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255-1276, 2001.
- Brown EJ, Schreiber SL.** A signaling pathway to translational control. *Cell*, v.86, p.517-520, 1996.
- Calder MD, Caveney AN, Sirard MA, Watson AJ.** Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocytes complexes during maturation *in vitro*. *Fertil Steril*, v.83, p.1077-1085, 2005.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ.** Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.14, 2003.
- Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT.** Antioxidant enzyme activity and oxidative stress on bovine oocyte *in vitro* maturation. *IUBMB Life*, v.51, p.57-64, 2001.
- Colgan DF, Murthy KKG, Prives C, Manley JL.** Cell-cycle related regulation of poli-(A) polymerase by phosphorylation. *Nature*, v.384, p.282-285, 1996.
- Conner S, Leaf D, Wessel GM.** Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the *Sea urchin* egg. *Mol Reprod Dev*, v.48, p.106-118, 1997.
- Couttet P, Fromont-Racine M, Steel D, Pictet R, Grange T.** Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.94, p.5628-5633, 1997.
- Cummins JM.** The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.115, p.S23-S29, 2004.
- Davidson EH.** *Gene activity in early development*. New York: Academic Press, 1986. 642p.
- De Matos DG, Furnus CC.** The importance of having high glutathione level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, v.53, p.761-771, 2000.
- Eckert J, Pugh PA, Niemann H, Tervit HR.** Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, v.10, p.327-332, 1998.
- Fair T, Hyttel P, Lonergan P, Bolando MP.** Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. *Biol Reprod*, v.64, p.1516-1525, 2001.
- Fan HY, Sun QY.** Involvement of MAPK cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*, v.70, p.535-547, 2004.
- 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*, 71:836-848, 2009.
- Fulka Jr J, First NL, Moor RM.** Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*, v.4, p.41-49, 1998.
- Furnus CC, Matos DG.** The availability of cyteine in culture medium appers to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. *Theriogenology*, v.51, p.373, 1999. (Abstract).
- Gavin AC, Schoreret-Slatkine S.** Ribosomal S6kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylation correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.46, p.383-391, 1997.
- Haley SA, Wessel GM.** Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. *Mol Cell Biol*, v.15, p.2084-2092, 2004.
- Herrick JR, Brad AM, Krisher RL, Pope WF.** Intracelular adenosine triphosphate and glutathione concentrations in oocytes from first estrous and testosterone-treated gilts. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.123-131, 2003.
- Hosoe M, Shioya Y.** Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, v.5, p.371-376, 1997.
- Hyttel P, Fair T, Callensen H, Greve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.
- Hyttel P, Viuff D, Fair T, Launricik J, Thomsen PD, Callensen H, Vos PLAM, Hendriksen PJM, Dieleman SJ, Schellander K, Besenfelder U, Greve T.** Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*, v.122, p.21-30, 2001.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T.** Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil*, v.78, p.615-625, 1986.
- Jackson RJ, Standart N.** Do poly-(A) tail and 3'untranslated region control mRNA translation? *Cell*, v.62, p.15-24, 1990.
- Jones KT.** Turn it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod*, v.10, p.1-5, 2004.
- Jones KT, Carrol J, Merriman JA, Wittingham DG, Kono T.** Repetitive sperm-induced Ca²⁺ transients in mouse oocytes are cell cycle-dependent. *Development*, v.121, p.3259-3266, 1995.

- Kline D.** Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. *Curr Top Dev Biol*, v.50, p.125-154, 2000.
- Krischek C, Meinecke B.** *In vitro* maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. *Anim Reprod Sci*, v. 73, p.129-140, 2002.
- Krisher RL, Bavister BD.** Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, v.49, p.103-114, 1998.
- Kruip TAM, Cran DG, Van Beneden TH, Dieleman SJ.** Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gametes Res*, v.8, p.29-47, 1983.
- Levesque JT, Sirard MA.** Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B1 in bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.55, p.1427-1436, 1996.
- Li GP, Liu Y, Bunch TD, Whitw KL, Aston KI.** Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase II to metaphase III. *Mol Reprod Dev*, v.71, p.220-226, 2005.
- Lippincott-Schwartz J, Roberts TH, Hirshberg K.** Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.16, p.557-589, 2000.
- Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL.** Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod*, v.62, p.1745-1753, 2000.
- Loneragan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, Boland M.** Relationship between time of first cleavage and the expression of the IGF-I growth factor, its receptor and two housekeeping genes in bovine two cell embryos and blastocyst produced in vitro. *Mol Reprod Dev*, v.57, p.146-152, 2000.
- Lu DP, Tian L, O'Neill C, King NJ.** Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes, peri-implantation and post-implantation embryos. *Cell Res*, v.12, p.373-383, 2002.
- Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, Garcia SM.** Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.13-20, 2004.
- Mendez R, Richter JD.** Translational control by CPEB: a means to the end. *Mol Cell Biol*, v.2, p.521-529, 2001.
- Meric F, Searfoss AM, Wormington M, Wolffe AP.** Masking and unmasking maternal mRNA. The role of polyadenylation, splicing and nuclear history. *J Biol Chem*, v.48, p.30804-308010, 1996.
- Modina S, Luciano AM, Vasse R, Baraldi-Scesi L, Lauria A, Gandolfi F.** Oocyte developmental competence after *in vitro* maturation depends on the persistence of cumulus-oocyte communications which are linked to the intracellular concentration of cAMP. *Ital J Anat Embryol*, v.106, p.241-248, 2001.
- Moreno RD, Schatten G, Ramalho-Santos J.** Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte *in vitro* maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. *Biol Reprod*, v.66, p.1259-1266, 2002.
- Myiamura Y, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M.** Glutathione concentration during maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.43, 282 abstr, 1995.
- Nohl H, Gille L, Staniek K.** Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol*, v.69, p.719-723, 2005.
- Payne C, Schatten G.** Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Dev Biol*, v.264, p.50-63, 2003.
- Rodriguez KF, Farin CE.** Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.55-67, 2004.
- Sasayama T, Marumoto T, Kunitoku N, Zhang D, Tamaki N, Kohmura E, Saya H, Hirota T.** Over-expression of Aurora-A targets cytoplasmic polyadenylation element binding protein and promotes mRNA polyadenylation of Cdk1 and cyclin B1. *Genes Cells*, v.10, p.627-638, 2005.
- Shim C, Lee SG, Song WK, Lee CS, Lee KK, Kim L.** Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*, v.48, p.185-193, 1997.
- Sirard MA.** Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241-1254, 2001.
- Stebbins-Boaz B, Hake LE, Richter JD.** CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and *c-mos* mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J*, v.15, p.2582-2592, 1996.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E.** Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod*, v.64, p.904-909, 2001.
- Stricker SA.** Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Sem Cell Dev Biol*, v.17, p.303-313, 2006.
- Tarazona AM, Rodrigues JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M.** Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.5-11, 2006.
- Thach RE.** Cap recap: the involvement of the eIF-4F in regulating gene expression. *Cell*, v.68, p.177-180, 1992.
- Thibault D, Szollosi D, Gérard M.** Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*, v.27, p.865-896, 1987.



- 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*, v.37, p.86-91, 2002.
- 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*, v.72, p.1037-1044, 2005.
- Trimarchi JR, Liu L, Portefield DM, Smith PJ, Keefe DL.** Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*, v.62, p.1866-1874, 2000.
- Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S.** The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol.*, v.209, p.117-206, 2001.
- Wessel GM, Conner SD, Berg L.** Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the *Sea urchin* oocyte. *Development*, v.126, p.4315-4325, 2002.
-