

**INES CRISTINA GIOMETTI**

# **OOGÊNESE EM BOVINOS**

**Monografia apresentada à disciplina Seminários I, do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.**

**Docentes responsáveis :**

**Profa. Dra. Maria Denise Lopes e Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo**

**Botucatu – São Paulo**

**2 0 0 2**

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                               | 03 |
| INTRODUÇÃO.....  | 04 |
| OOGÊNESE.....  | 05 |
| MITOSE E MEIOSE.....                                     | 05 |
| COMPETÊNCIA MEIÓTICA.....                                | 06 |
| DIFERENCIAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA NA MATURAÇÃO..... | 07 |
| REGULAÇÃO NA MATURAÇÃO DO OÓCITO.....                    | 09 |
| INIBIÇÃO NA MATURAÇÃO DOS OÓCITOS.....                   | 10 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                | 11 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                          | 12 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**AI** = Anáfase I

**AMPc** = monofosfato de adenosina cíclico

**c-kit** = receptor do KL – “kit ligand”

**DNA** = ácido desoxirribunucleico

**EGF** = fator de crescimento epidermal

**ERK** = “extracellular regulated kinase” ou MAPquinase

**FGFb** = fator de crescimento fibroblástico básico

**G<sub>1</sub>** = Fase em que o gameta é diplóide – 2n

**G<sub>2</sub>** = Fase em que o gameta é 4n

**GVBD** = Rompimento da vesícula germinativa

**IP<sub>3</sub>** = inositol trifosfato

**LH** = Hormônio luteinizante

**M** = Fase de divisão mitótica

**M<sub>1</sub>** = Primeira divisão meiótica

**M<sub>2</sub>** = Segunda divisão meiótica

**MI** = Metáfase I

**MII** = Metáfase II

**MAP** = “mitogen-activate protein”

**MPF** = fator promotor da fase M intracelular

**PK-C** = Proteína quinase-C

**RNA<sub>m</sub>** = Ácido ribonucleico mensageiro

**RNA<sub>r</sub>** = Ácido ribonucleico ribossômico

**S** = Fase de síntese de DNA

**TI** = Telófase I

**VG** = Vesícula germinativa

## INTRODUÇÃO

Os oócitos bovinos devem sofrer várias mudanças morfológicas e bioquímicas para adquirirem a competência meiótica necessária para reiniciarem a meiose, serem fertilizados e terem um adequado desenvolvimento embrionário. Mudanças estruturais e bioquímicas ocorrem durante a maturação do oócito competente depois do pico pré-ovulatório de LH. O reinício e a completa maturação meiótica são regulados por processos de fosforilação e desfosforilação.

Pesquisadores do mundo inteiro têm dedicado muitos esforços para determinar a função de uma variedade de eventos e fatores envolvidos na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos diferentes espécies animais. As técnicas moleculares e os procedimentos *in vitro* são muito importantes para investigar aspectos fisiológicos e bioquímicos da maturação do oócito. O entendimento da regulação da maturação do oócito é a base para produzir novas biotecnologias que busquem um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo de uma fêmea. O objetivo deste trabalho é discutir alguns eventos celulares e moleculares relacionados aos processos de desenvolvimento e maturação do oócito bovino.

## OOGÊNESE

A oogênese pode ser definida como sendo um processo de formação, crescimento e maturação do gameta feminino, que tem início na vida fetal e culmina anos depois, pouco antes da ovulação, no animal adulto. A oogênese começa com a formação das células germinativas primordiais, cuja origem é extragonadal, sendo oriundas da porção caudal da linha primitiva, provenientes das células tronco embrionárias (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994). Com a formação dos cordões sexuais, nos bovinos aos trinta dias de gestação, as células somáticas que acompanharam a trajetória das células germinativas até a crista genital, circundam o gameta e o isolam através de uma membrana basal. A interação entre as células da granulosa e o gameta é de fundamental importância para o desenvolvimento do oócito (CAIN *et al.*, 1995), as trocas metabólicas entre esses dois tipos de células ocorre através dos complexos intercomunicantes (EPPIG & SHROEDER, 1989).

As células germinativas primordiais transformam-se em oogônias, as quais diferenciam-se das outras células por apresentarem um citoplasma claro, devido a pouca quantidade de organelas e apresentarem uma alta frequência de divisão mitótica, chegando a 2.700.000 oogônias no dia 110 de gestação (ERICKSON, 1966). Porém, esse número diminui, já que muitos oócitos sofrem processos degenerativos como resultado de erros genéticos ocorridos durante o “crossing over” ou a distúrbios metabólicos e/ou vasculares (MOTTA *et al.*, 1997). Em torno dos 72-82 dias de gestação na vaca, alguns oócitos já iniciaram a primeira prófase meiótica (ERICKSON, 1966). Quando cessa a divisão mitótica das oogônias, e essas estão em um folículo primordial, passam a ser chamadas de oócitos primários (RICHARDS, 1980).

Pouco antes do nascimento, os oócitos encontram-se no estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica, também denominado estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (VG) devido a aparência vesicular do núcleo, caracterizando-se pela presença de cromossomos altamente difusos. Neste estágio ocorre o primeiro bloqueio da meiose, sendo a primeira divisão meiótica iniciada e concluída somente pouco antes da ovulação, após a puberdade.

## MITOSE E MEIOSE

O ciclo celular da mitose consiste em fases alternativas,  $G_1$  (o gameta é diplóide –  $2n$ ),  $S$  (síntese de DNA),  $G_2$  (o gameta é  $4n$ ) e  $M$  (de divisão mitótica). A fase  $S$  dobra o número de cromossomos, de  $2n$  para  $4n$ . Na fase  $M$ , os cromossomos voltam a ser  $2n$  porque as cromátides

irmãs duplicadas são separadas. A fase M é subdividida em cinco estádios: prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase. A fase G é a mais longa do ciclo e é a fase em que os oócitos permanecem parados.

Na meiose, o gameta  $2n$  tem o seu DNA duplicado numa fase S “pré-meiótica”, depois vem a fase  $M_1$  (primeira divisão meiótica). Como ocorre duas sucessivas divisões  $M_1$  e  $M_2$ , sem uma fase S no meio, ao final da  $M_2$ , tem-se uma célula haplóide ( $1n$ ). O gameta feminino forma durante cada divisão meiótica um corpúsculo polar para ser eliminado, na  $M_1$  com metade dos cromossomos e na  $M_2$  com metade das cromátides, como citado por Sagata (1996).

### COMPETÊNCIA MEIÓTICA

Competência meiótica é a fase de crescimento do oócito, em que o mesmo deve passar por diversas mudanças fisiológicas e bioquímicas para estar apto para sofrer o processo de meiose, essa fase também é conhecida como capacitação meiótica. A competência para reiniciar a maturação meiótica é obtida no final da fase de desenvolvimento, quando os oócitos estão em folículos antrais. Os oócitos bovinos crescem de menos de  $30\mu\text{m}$  (em folículo primordial) a mais de  $120\mu\text{m}$  (em folículo ovulatório), como mencionado por Hyttel *et al.* (1997). Os oócitos devem adquirir a competência meiótica para responder ao estímulo hormonal antes da ovulação e sofrer maturação. Em geral, a completa competência meiótica é finalizada quando os folículos atingem um diâmetro de  $3\text{mm}$  e os oócitos  $110\mu\text{m}$  de diâmetro (FAIR *et al.*, 1995).

Nos folículos primordiais, o núcleo do oócito é rodeado pelas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e um pequeno complexo de Golgi. Como foi demonstrado por Motlik e Fulka (1986), os nucleolos do oócito apresentam-se vacuolizados e com estruturas heterogêneas compostas de elementos fibrilgranulares com discretos centros fibrilares, neste estágio de desenvolvimento. Os nucleolos têm um importante papel na síntese de ácido ribonucleico ribossômico (RNAr). A síntese das proteínas da zona pelúcida começa nos folículos primordiais (VAN WEZEL & RODGERS, 1996), embora a zona pelúcida esteja morfológicamente presente somente nos oócitos dos folículos secundários (HYTTEL *et al.*, 1997). Nesses folículos o oócito já apresenta “gap junctions” e o nucleolo aparece com alguns pontos negros na auto-radiografia após incubação com  $H^3$ - uridina (FAIR *et al.*, 1996).

As modificações principais observadas durante a fase de desenvolvimento do oócito são a formação dos “gap junctions” entre o oócito e suas células somáticas circundantes, desenvolvimento e deslocamento para a periferia do oócito do complexo de Golgi, do retículo

endoplasmático liso, e das gotas lipídicas, formação dos grânulos corticais e zona pelúcida, diferenciação da mitocôndria, quebra dos centríolos, deposição ou síntese dos RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) maternos para a síntese de proteína do oócito, das células somáticas e mais tarde para o desenvolvimento (FAIR *et al.*, 1996; HYTTEL *et al.*, 1997). Além disso, o nucleolo torna-se uma esfera de fibrilas empacotadas densamente e pode ser vacuolizada (FAIR *et al.*, 1996). Com essa ultra-estrutura e outras transformações bioquímicas, os oócitos estão aptos para serem maturados e fecundados.

Há uma sólida evidência que pelo menos três fatores estão envolvidos no crescimento do oócito nesta fase de competência meiótica, o c-kit (receptor do KL – “kit ligand”), o EGF (fator de crescimento epidermal) e FGFb (fator de crescimento fibroblástico básico). Packer *et al.* (1994) observaram um efeito estimulatório do KL no crescimento do oócito, além disso, observou que as células da granulosa, quando cultivadas com o oócito, aumentam a expressão de KL. EGF e FGF estimulam o aumento no número de células da granulosa, aumentando a quantidade de KL produzida por essa camada e estimulando assim o crescimento do oócito. Bloqueando a interação entre o c-kit e o KL in vivo o crescimento do oócito e do folículo foi completamente interrompido (YOSHIDA *et al.*, 1997).

## **DIFERENCIAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DURANTE A MATURAÇÃO DO OÓCITO**

O oócito competente deve sofrer uma maturação nuclear e citoplasmática para ter um desenvolvimento normal. Do mesmo modo, as células somáticas têm um importante papel na regulação do processo de maturação do oócito. A meiose do oócito é iniciada durante o desenvolvimento dos ovários fetais e a primeira divisão meiótica é mantida no estágio de diplóteno (formação da vesícula germinativa) por muitos anos até atingir a puberdade. O núcleo sofre desintegração e a membrana nuclear (vesícula germinativa) é completamente desintegrada dentro de vesículas de membranas, as quais associam-se ao retículo endoplasmático para participar na formação da membrana do pró-núcleo. Os oócitos passam pelos estádios de diaquinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e então rapidamente passam para metáfase II (MII). Como resultado dessas mudanças, os cromossomos homólogos se separam com a formação do primeiro corpúsculo polar. Esse corpúsculo polar contém uma pequena parte do citoplasma e a metade dos cromossomos homólogos. Ao mesmo tempo, o oócito pára o desenvolvimento nuclear (segunda parada meiótica) e permanece nesse estágio até a

fecundação. O processo de ativação do oócito em estágio de vesícula germinativa, incluindo o rompimento da vesícula germinativa (“germinal vesicle breakdown”, GVBD) até a segunda parada meiótica em MII é a completa maturação nuclear. O tempo requerido para a maturação nuclear varia dependendo da espécie, no bovino, o GVBD ocorre de 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI de 15-18 horas e a MII de 18-22 horas (SIRARD *et al.*, 1989; WU *et al.*, 1997).

Os fatores citoplasmáticos que originam durante o desenvolvimento e maturação dos oócitos são essenciais para a capacidade de desenvolvimento, aquisição da competência meiótica, fertilização e desenvolvimento embrionário. Os oócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não irão ter um desenvolvimento embrionário (BEVERIS *et al.*, 1997; BLONDIN *et al.*, 1997; HYTTEL *et al.*, 1997). Há uma significativa mudança na síntese proteica detectável após o pico de LH (hormônio luteinizante). O conjunto de processos na maturação parecem ser afetados por essas mudanças nos níveis proteicos e em outros fatores promotores de maturação detectados no citoplasma de oócitos em maturação (CRAN, 1989; LIU & YANG; 1999; MOTLIK, 1989; MOTLIK *et al.*, 1998).

A modulação da síntese proteica e outros fatores são observados com a reorganização das organelas citoplasmáticas durante a maturação do oócito. Mudanças no número, tamanho e/ou posição das organelas citoplasmáticas tem sido observado nos oócitos de mamíferos. No decorrer do remodelamento do citoplasma, a maioria das organelas migram para o centro da célula. As mitocôndrias e o Complexo de Golgi localizavam-se periféricamente no oócito imaturo, porém após a maturação as mitocôndrias estão distribuídas mais centralmente na superfície do ooplasma e o complexo de Golgi diminui o seu desenvolvimento simultaneamente com o agrupamento do retículo endoplasmático liso (HITTEL *et al.*, 1989). Entretanto, os grânulos corticais associados com um segmento do retículo endoplasmático liso, permanecem próximo à periferia da célula. Há um aumento no número dos grânulos corticais depois do pico de LH (CRAN, 1989; FAIR *et al.*, 1997). O número de grânulos corticais no córtex é significativamente maior nos oócitos após o GVBD que aqueles observados nos oócitos com a vesícula germinativa intacta.

A comunicação entre as células do cumulus e o oócito é através de “gap junctions”, as células somáticas processam um canal através da zona pelúcida para troca de substâncias com o citosol do oócito. Após o pico de LH há uma evidente diminuição do fluxo de substâncias das células da granulosa para o oócito e ocorrem mudanças morfológicas nos “gap junctions”. A



maturação do oócito parece estar correlacionada negativamente com o número de “gap junctions” por célula (LARSEN *et al.*, 1986).

## REGULAÇÃO DA MATURAÇÃO DO OÓCITO

Os oócitos devem crescer e sofrer várias mudanças ultra-estruturais, no citoesqueleto e bioquímicas para ser competentes para reiniciar e completar a maturação meiótica. Oócitos incompetentes são deficientes em RNAm para o fator promotor da fase M intracelular (MPF). Os oócitos reiniciam a primeira divisão meiótica depois do estímulo hormonal *in vivo*. Provavelmente, esse é um sinal comum para ativar o MPF e a MAP (“mitogen-activate protein”) quinase para a maturação dos oócitos nos mamíferos (DEKEL, 1996).

O MPF é composto de dois componentes, a proteína p34<sup>cdc2</sup> que controla a divisão celular (subunidade catalítica de 34 kD) e a proteína ciclina B (subunidade regulatória de 45 kD). Para o MPF ser ativado, a treonina-14 e a tirosina-15 da subunidade catalítica devem ser desfosforilado pela enzima cdc25 fosfatase (KUMAGAI & DUNPHY, 1992; MALLER, 1994). Os oócitos em fase de crescimento têm menores níveis de p34<sup>cdc2</sup> e não podem progredir da fase G<sub>2</sub> a M, porém no fim da fase de crescimento há um grande aumento na concentração e na atividade do p34<sup>cdc2</sup> para a aquisição da competência meiótica (CHESNEL & EPPIG, 1995; DE VANTERY *et al.*, 1996; HIRAO *et al.*, 1995).

O MPF tem uma forte afinidade pela quinase da histona H1. Nos oócitos bovinos, essa quinase está em menores níveis no estágio de vesícula germinativa e tem um aumento gradual até atingir seu pico no estágio de MI. Depois deste ponto, a quinase da histona H1 (atividade do MPF) tem uma diminuição na sua concentração, que coincide com a AI e a TI. Um maior aumento da atividade do MPF é observado na MII, que é mantido por várias horas durante a maturação do oócito, diminuindo gradualmente depois de 30 horas da maturação do oócito (WU *et al.*, 1997).

Em mamíferos há várias evidências que vários eventos que ocorrem durante a maturação do oócito são regulados pela MAP quinase, também chamada de ERK (“extracellular regulated kinase”). A família da MAP quinase é ativada em consequência da fosforilação de uma tirosina e uma treonina específicas durante a maturação do oócito. No bovino, a MAP quinase é ativada no estágio de GVBD, e tem sua atividade máxima em MI e permanece com alta atividade até a

formação dos pró-núcleos (NURSE, 1990; FISSORE *et al.*, 1996). Esses achados sugerem que a MAP quinase deve estar envolvida no processo de fecundação.

Há evidências que a maturação de oócitos é dependente de hormônios esteróides e de sinais químicos determinados por hormônios proteicos e fatores de crescimento. Esses sinais ativam receptores presentes na membrana citoplasmática, estimulando a formação intracelular de segundos mensageiros (BERRIDGE, 1985), como o diacilglicerol, o inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e cálcio, os quais por ativação de quinases e fosfatases estão envolvidos na transmissão do sinal da membrana celular ao núcleo (BAE & CHANNING, 1985; HOMA, 1991; HOMA *et al.*, 1991; KAUFMAN & HOMA, 1993). O AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) tem uma função inibitória na maturação nuclear de oócitos de muitas espécies. No bovino, o AMPc induz uma inibição transitória do GVBD, mas não impede a progressão até MI (HOMA, 1988; SIRARD, 1990; BILODEAU *et al.*, 1993; HERNÁNDEZ *et al.*, 1994). Substâncias que ativam a proteína quinase-C (PK-C) estimulam o reinício da meiose (MONDADORI *et al.*, 1999).

### INIBIÇÃO NA MATURAÇÃO DOS OÓCITOS

Os oócitos reiniciam a meiose após o pico ovulatório de LH, os fatores que levam ao reinício da meiose ainda são desconhecidos. Os oócitos reiniciam a meiose espontaneamente quando isolados de seus folículos e cultivados *in vitro* (EDWARDS, 1965).

Em grandes animais, foi observado que a parede folicular promove inibição meiótica quando os oócitos são cultivados com metades foliculares, com ou sem contato físico (TSAFRIRI & CHANNING, 1975; LEIBFRIED & FIRST, 1980; SIRARD & COENEN, 1993). Quando os oócitos de bovinos com as células do cumulus são maturados na presença da teca interna ou externa de folículos de 2-5 mm, há uma inibição no reinício da meiose. O fator de inibição produzido pelas células da teca é solúvel no meio e age através das células do cumulus (RICHARD & SIRARD, 1996). Os oócitos bovinos que foram cultivados em meio condicionado com células foliculares também tiveram uma inibição na maturação meiótica. RICHARD & SIRARD (1998) demonstraram a presença de duas proteínas (210 e 190 kDa) que são secretadas no meio contendo células da teca, uma dessas proteínas, ou as duas, podem ser responsáveis pela inibição da maturação de oócitos bovinos quando cultivados na presença de células da teca.

As células da granulosa também inibem a maturação nuclear de oócitos bovinos, quando na presença de líquido folicular (GONÇALVES *et al.*, 2001). Oócitos bovinos maturados em

líquido folicular de folículos pequenos tiveram uma inibição na maturação quando comparados àqueles cultivados em meio de maturação (AYOUB & HUNTER, 1993; CHOI *et al.*, 1998; EMANUELLI *et al.*, 2000).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante todo o processo de oogênese em bovinos, o gameta deve sofrer diversas mudanças morfológicas e bioquímicas e essas modificações são reguladas por hormônios e proteínas presentes no ovário. Fisiologicamente, o oócito deve ter uma sincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear. Esse processo é regulado pelas cascatas de fosforilação e desfosforilação e controlado pelo MPF e a MAP quinase. Ainda não se sabe qual é o sinal que ativa o oócito a reiniciar a meiose, sabe-se apenas que após o pico de LH ocorrem essas mudanças no interior do oócito e modificações nas concentrações de algumas substâncias no líquido folicular. Provavelmente, o LH atue através de hormônios proteicos e/ou fatores de crescimento presentes no interior do folículo, através da inibição ou do estímulo da produção dessas substâncias pelas células foliculares. O completo entendimento da fisiologia do processo de oogênese é necessário para melhorar a produção de embriões *in vitro* e ter-se um melhor aproveitamento dos gametas femininos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYOUB, M.A., HUNTER, A.G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.1, p.95-100, 1993.
- BAE, I.H.; CHANNING, C.P. Effect of calcium-ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian-follicles. **Biology of Reproduction**, v.33, p.79-87, 1985.
- BERRIDGE, M.J. The molecular basis of communication within the cell. **Scientific American**, v.253, p.142-152, 1985.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R. *et al.* Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.
- BILODEAU, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of adenylyate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMPc content of zona-free and cumulus-enclosed bovine in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.5-11, 1993.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUIBAULT, L.A. *et al.* In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.47, p.1061-1075, 1997.
- CAIN, L.; CHATTERJEE, S.; COLLINS, T.J. In vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. **Endocrinology**, v.136, n.8, p.3369-3377, 1995.
- CHESNEL, F.; EPPIG, J.J. Synthesis and accumulation of p34<sup>cdc2</sup> and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. **Molecular Reproduction Development**, v.40, p.503-508, 1995.
- CHOI, Y.H., TAKAGI, M., KAMISHITA, H., *et al.* Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n.1,2, p.27-33, 1998.
- CRAN, D. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.49-62, 1989.
- DE VANTERY, C.; GAVIN, A.C.; VASSALI, J.D. *et al.* An accumulation of p34<sup>cdc2</sup> at the end mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Developmental Biology**, v.174, p.335-344, 1996.
- DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.82-88, 1996.
- EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, p.349-351, 1965.
- EMANUELLI, I.P., COSTA, L.F.S., EMANUELLI, M.P., *et al.* Líquido Follicular na inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p.246, 2000.

EPPIG, J.J.; SHROEDER, A.C. Capacity of mouse from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v.41, p.268-276, 1989.

ERICKSON, B.H. Developmental and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, p.97-105, 1966.

FAIR, T.; HITTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.437-442, 1995.

FAIR, T.; HITTEL, P.; GREVE, T. *et al.* Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.503-512, 1996.

FAIR, T.; HULSHOP, S.C.; HITTEL, P. *et al.* Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v.195, p.327-336, 1997.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VANDE WOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1261-1270, 1996.

GONÇALVES, P.B., EMANUELLI, I.P., COSTA, M.P., *et al.* The inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro oocyte nuclear maturation depends on the follicular size. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.473, 2001.

HERNÁNDEZ, A.G.; SCHWEITZER, C.M.; MONTAGNER, M.M. *et al.* Função do AMPc na maturação nuclear e mucificação das células do cumulus em oócitos bovinos. **Zootecnia**, v.32, p.41, 1994.

HOMA, S.T. Effects of cyclic AMPc on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in the chemically defined medium. **Journal of Experimental Zoology**, v.248, p.222-231, 1988.

HOMA, S.T. Neomycin, an inhibitor of phosphoinositide hydrolysis, inhibits the resumption of bovine oocyte spontaneous meiotic maturation. **Journal of Experimental Zoology**, v.258, p.95-103, 1991.

HOMA, S.T.; WEBSTER, S.D., RUSSEL, R.K. Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle breakdown of the bovine oocyte – effects of a cyclic -AMP phosphodiesterase inhibitor. **Developmental Biology**, v.146, p.461-472, 1991.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H. *et al.* Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. *et al.* Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

KAUFMAN, M.L.; HOMA, S.T. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, p.69-76, 1993.

KUMAGAI, A.; DUNPHY, W.G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. **Cell**, v.70, p.139-151, 1992.

LARSEN, W.; WERT, S.; BRUNNER, G. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdowns in rat oocytes. **Developmental Biology**, v.113, p.517-521, 1986.

LEIBFRIED, L., FIRST, N.L. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. **Biology of Reproduction**, v.23, p.705-709, 1980.

LIU, L.; YANG, X.; Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase to interphase transition of activated bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1-7, 1999.

MALLER, J.L. Biochemistry of cell cycle checkpoints at the G2/M and metaphase/anaphase transitions. **Seminars in Developmental Biology**, v.5, p.183-190, 1994.

MONDADORI, R.G.; GONÇALVES, P.B.D.; NEVES, J.P. *et al.* Fecundação e clivagem após a ativação da proteína quinase C durante a maturação de oócitos bovinos. **Ciência Rural**, v.29, p.105-110, 1999.

MOTTA, P.M.; NOTTOLA, S.A.; MAKABE, S. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.75, p.5-10, 1997.

MOTLIK, J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.17-25, 1989.

MOTLIK, J.; KUBELKA, M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.27, p.366-375, 1990.

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M. *et al.* Interplay between cdc2 and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.461-469, 1998.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v.344, p.503-508, 1990.

PACKER, A.I.; HON, Y.C.; BESMER, P. *et al.* The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. **Developmental Biology**, v.161, p.194-205, 1994.

RICHARD, F.J., SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.54, p.22-28, 1996.

RICHARD, F.J., SIRARD, M.A. Theca cell monolayers that inhibit maturation of bovine oocytes show differences in their protein secretion pattern. **Molecular Reproduction and Development**, v.50, p.200-206, 1998.

RICHARDS, J. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiology Reviews**, v.60, p.51-89, 1980.

SAGATA, N. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. **Cell Biology**, v.6, p.22-28, 1996.

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. *et al.* Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.40, p.1257-1263, 1989.

SIRARD, M.A. Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.33, p.757-767, 1990.

SIRARD, M.A., COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. **Theriogenology**, v.40, p.933-942, 1993.

TSAFRIRI, A., CHANNING, C.P. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. **Endocrinology**, v.96, p.922-927, 1975.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1003-1011, 1996.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. Mammalian ovum. In: Knobil, E.; Neil, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994. Cap.3, p.79-123.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, B. *et al.* Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.56, p.253-259, 1997.

YOSHIDA, H.; TAKAMURA, N.; KATAOKA, H. *et al.*, Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Developmental Biology**, v.184, p.122-137, 1997.