

ASSINCRONIA ENTRE MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA EM OÓCITOS BOVINOS: AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA PARA SUPORTAR A EMBRIOGÊNESE INICIAL

Elisa Melo Ferreira¹

Alessandra Aparecida Vireque¹

Paula Andréa de Albuquerque Salles Navarro¹

Rui Alberto Ferriani¹

RESUMO

A maturação do oócito é um processo chave para os eventos subsequentes do desenvolvimento e envolve mecanismos complexos e distintos, embora interligados, denominados maturação nuclear e maturação citoplasmática. A maturação nuclear refere-se, principalmente, aos eventos de segregação cromossômica, enquanto a maturação citoplasmática abrange toda a reorganização das organelas, acúmulo de mRNAs, proteínas e fatores de transcrição que atuam tanto no processo global de maturação, quanto na fertilização, ativação do genoma embrionário e embriogênese inicial. Assim, subdividimos, didaticamente, a maturação citoplasmática em: 1) Redistribuição das organelas; 2) Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto; e 3) Maturação molecular. Análises ultra-estruturais revelam que as mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, grânulos corticais e complexo de Golgi assumem posições diferentes daquelas observadas no estágio de vesícula germinativa, ao atingir o estágio de metáfase II. Os microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto, presentes no citoplasma, realizam essa movimentação, além de atuarem na segregação dos cromossomos. A maturação molecular caracteriza-se pela transcrição, armazenamento e processamento do mRNA materno, que é acumulado em uma forma inativa estável até o recrutamento para a tradução. A poliadenilação é um dos principais mecanismos de início de tradução de proteínas e consiste na adição de adeninas à porção 3' terminal do mRNA. Durante essa fase, são transcritos, principalmente, os reguladores do ciclo celular, proteínas e moléculas marcadoras de maturação citoplasmática e componentes do sistema enzimático antioxidante. Portanto, o objetivo dessa revisão é focar o processo de maturação citoplasmática, analisando as modificações que ocorrem nesse compartimento durante a aquisição de competência meiótica para o desenvolvimento.

Palavras-chaves: Maturação Citoplasmática, Oócitos Bovinos, Organelas, Citoesqueleto, Maturação Molecular

ABSTRACT

Oocyte maturation is a key process for the subsequent events of development and involves complex and distinct mechanisms, although linked, denoted nuclear and cytoplasmic maturation. Nuclear maturation mainly involves chromosomal segregation, while cytoplasmic maturation involves organelle reorganization and storage of mRNA, protein and transcription factors, which act both in the overall maturation process and in fertilization, embryo genome activation and early embryogenesis. Thus, we subdivided cytoplasmic maturation, didactically, into: 1) Organelle redistribution, 2) Cytoskeleton dynamics, and 3) Molecular maturation. Ultrastructural analysis shows that mitochondria, ribosomes, endoplasmic reticulum, cortical granules and Golgi complex assume different positions from those observed in germinal vesicle oocytes when achieving metaphase II. The microfilaments and

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

microtubules of the cytoskeleton present in the cytoplasm promote these movements and act on chromosome segregation. Molecular maturation is characterized by the transcription, storage and processing of maternal mRNA, which is stored in a stable inactive form until being recruited for transduction. Polyadenylation is the main mechanism that initiates protein transduction and consists of the addition of adenines to the 3' terminal portion of mRNA. Cell cycle regulators, proteins, markers of cytoplasmic maturation and components of the enzymatic antioxidant system are mainly transcribed during this stage. Thus, the objective of this review was to focus on the cytoplasmic maturation process by analyzing the modifications that occur in this compartment during the acquisition of meiotic competence for development.

Key-words: Cytoplasmic Maturation, Bovine Oocytes, Organelles, Cytoskeleton, Molecular Maturation

1 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 proteínas, RNAm e fatores de transcrição, necessários para que o processo se realize.

O estoque de transcritos 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 (no caso de bovinos, diferente em outras espécies), quando o genoma embrionário é ativado e a síntese de proteínas “de novo” torna-se necessária. Essa fase é denominada Transição Materno-Zigótica (MZT) e a expressão de certos genes durante esse período determinarão 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. 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. Tais eventos são de fundamental relevância, uma vez que o embrião em seus estágios iniciais irá consumir todo o estoque de proteínas e RNAm que o oócito acumula durante seu desenvolvimento até a MZT.

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

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

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

1. Redistribuição das organelas citoplasmáticas

Já está bem estabelecido que, durante a maturação oocitária, inúmeras modificações ultra-estruturais 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, principalmente através de microtúbulos, e seu reposicionamento depende das necessidades da célula em cada estágio de desenvolvimento. As organelas envolvidas na maturação citoplasmática, investigadas nos últimos anos são: mitocôndrias, ribossomos, retículo endoplasmático, grânulos corticais e complexo de Golgi.

Mitocôndrias

A ativação de determinadas vias metabólicas, envolvidas na síntese e 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 toda a energia a ser consumida no processo de maturação (KRISHER & 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. Acredita-se que, durante a maturação, as mitocôndrias estão sintetizando todo o ATP necessário para a síntese de proteínas, que, por sua vez, irão dar suporte à conclusão dos processos de maturação e desenvolvimento embrionário subsequente (KRISHER & BAVISTER, 1998; STOJKOVIC, 2001).

Análises da ultra-estrutura de oócitos maturados *in vitro* 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), bem semelhante ao que foi observado *in vivo*, em que se notou uma distribuição mais periférica antes do pico de LH, uma formação cortical clusterizada nos estágios finais da maturação

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

nuclear e uma dispersão após a extrusão do corpúsculo polar, aproximadamente 19 horas após o pico de LH (KRUIP *et al.*, 1983). 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. Sabe-se que, durante o período de células germinativas pré-migratórias, o número de mitocôndrias gira em torno de 10 unidades, aumentando para 200 unidades no estágio de oogônia. Oócitos primários contêm aproximadamente 6000 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 MIV, 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). 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), resultantes do metabolismo mitocondrial (NOHL *et al.*, 2005; TARAZONA *et al.*, 2006), feita por moléculas “scavengers” como a glutathione e as peroxidases, produzidas durante a maturação molecular do oócito ou por transcrição permissiva no estágio embrionário de 2 células (LONERGAN *et al.*, 2000). Assim, se houvesse uma alta atividade mitocondrial durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, os embriões provavelmente não sobreviveriam, por não conseguirem eliminar a produção excessiva de ROS 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 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 um pool adequado de ribossomos esteja presente durante a maturação. Os ribossomos são sintetizados pela transcrição de genes de RNA ribossomal (RNAr), 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, conseqüentemente, a síntese protéica. 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 quebra da vesícula germinativa (GVBD). Ao alcançar o estágio de metáfase II, no entanto, o oócito exhibe níveis basais de tradução de proteínas (TOMEK *et al*, 2002). Tal fato poderia ser explicado pela ausência de um nucléolo funcional, uma vez que a cromatina está condensada em forma de cromossomos e, portanto, não haveria a transcrição de RNAr e, conseqüentemente, produção de ribossomos para a tradução do RNAm ou, então, oócitos bovinos em MII possuem um RNAm “ativado”, que não é efetivamente traduzido devido à ação de repressores específicos (TOMEK *et al*, 2002). Tais evidências corroboram, portanto, a idéia de que a presença dos ribossomos está diretamente ligada à síntese protéica nos períodos cruciais do desenvolvimento.

Retículo Endoplasmático (RE)

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

As membranas do RE são fisiologicamente ativas, interagem com o citoesqueleto e contêm diferentes domínios especializados em funções distintas. Dentre as funções do RE 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 RE 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 VG, o RE apresenta-se uniformemente distribuído no ooplasma. Ao progredir o desenvolvimento até o estágio de metáfase II, observou-se que o RE se apresenta em regiões corticais e acumula-se em pequenas porções de 1-2 μm de largura (clusters) por todo o citoplasma, exceto nas proximidades do aparato meiótico (KLINE, 2000; STRICKER, 2006). A sensibilidade do sistema de liberação de cálcio torna-se aumentada após a maturação. Durante a fertilização, a entrada do espermatozóide no oócito leva a uma dramática liberação de cálcio do retículo, que ativa o início do desenvolvimento (KLINE, 2000). Sendo assim, no momento de formação do segundo corpúsculo polar, os clusters do RE se desagregam, aproximadamente 3-4 h após a inseminação e 2 h antes de cessar a sinalização de cálcio no estágio pronuclear do desenvolvimento (JONES *et al.*, 1995; STRICKER, 2006) e voltam a aparecer somente nos estágios embrionários de 2-8 células (dados não publicados) (KLINE, 2000).

Grânulos corticais

A exocitose dos grânulos corticais é um dos mecanismos mais comuns para a prevenção da polispermia, apresentado pelo oócito (KRUIP *et al.*, 1983). Se houver fertilização por mais de um espermatozóide, o zigoto resultante sofrerá clivagens anormais e se tornará inviável, morrendo ainda no início das divisões mitóticas. Os grânulos corticais são organelas exclusivas dos oócitos e sua composição inclui uma diversa população de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanas. O mecanismo de bloqueio é altamente conservado entre os grupos animais e se baseia na rápida modificação da matriz extracelular oocitária,

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

pela liberação do conteúdo dos grânulos corticais na superfície externa, após a ativação do oócito pela entrada do espermatozóide (HALEY & WESSEL, 2004).

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 no estágio de VG, os grânulos corticais apresentam-se distribuídos em clusters pelo citoplasma (HOSOE & SHIOYA, 1997) e, ao final do período de maturação, quando o oócito atinge o estágio de MII, encontram-se distribuídos por toda a superfície interna, próximos à membrana plasmática (THIBAUT. *et al.*, 1987; WESSEL *et al*, 2001), estrategicamente dispostos, à espera da ativação.

Complexo de Golgi

A dinâmica das membranas do Golgi durante a maturação e fertilização nos mamíferos é um evento que ainda necessita de novas informações para ser completamente compreendido (PAYNE & 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 & SCHATTEN, 2003). Entretanto, a distribuição e modificação dessas vesículas após a extrusão do corpúsculo polar e inseminação ainda não foram totalmente esclarecidas (PAYNE & SCHATTEN, 2003).

Durante os processos de fertilização e divisão celular, em que os pronúcleos se unem e o zigoto começa sofrer sucessivas clivagens, há um extensivo tráfego de membranas, dependente de microtúbulos, entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (RE). Esse tráfego promove uma interligação dessas organelas com o envelope pronuclear, no caso da fertilização e também é necessário para que as vesículas carreadoras do Golgi alcancem os pontos de invaginação da membrana na citocinese, no caso da clivagem embrionária (ROUVIÈRE *et al.*, 1994; DANILCHIK *et al.*, 1998; SKOP, *et al.*, 2001; PAYNE & SCHATTEN, 2003).

Apesar dos achados até o momento, os dados da literatura com relação ao papel exercido pelo aparato de Golgi na maturação e eventos subseqüentes permanecem conflitantes. Um estudo recente mostrou que, ao contrário do que ocorre em células somáticas, nas células germinativas em MII, proteínas da matriz extracelular, como a GM130 encontrada nas membranas do complexo de Golgi, são

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

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 aparato 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 tráfego 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 que a dose de BFA utilizada tenha sido baixa e, por isso, insuficiente para inibir a secreção (PAYNE & SCHATTEEN, 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.

2. 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

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

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 VG, 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). 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 VG 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). No estágio de metáfase I, os microtúbulos são nucleados pela polimerização da tubulina, a partir dos centrossomos ou centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), 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 & SUN, 2004). A placa metafásica em MI é proporcionalmente maior do que a que é formada em MII e, nessa fase, os filamentos de actina estão fortemente distribuídos na região cortical e ausentes entre os MTs. O fuso tem uma forma de barril e seus pólos 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 MTs 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. No estágio de TI, os MTs que estão entre os conjuntos cromossômicos formam uma estrutura triangular semelhante a cones que têm uma porção mais larga e outra porção mais fina. A porção mais larga de MTs 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

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

subseqüentes, 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 TI para MII não há um novo período de intérfase, apenas uma rápida condensação da cromatina e desaparecimento dos microfilamentos e dos MTs do fuso meiótico, referida como intercinese (FAN & SUN, 2004). A placa metafásica reaparece logo em seguida. Como dito anteriormente, o aparato meiótico em MII é menor do que o observado em MI, o que poderia ser explicado pela redução do número de cromossomos que, agora, correspondem à metade do número inicial (Li *et al.*, 2005).

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 como um todo, em função da aquisição de competência do material nuclear para a progressão do desenvolvimento.

3. 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 do RNAm expresso pelos cromossomos, que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos. As proteínas derivadas desse RNAm estão envolvidas tanto na maturação, quanto nos eventos celulares subseqüentes: fertilização, formação de pronúcleos e embriogênese inicial, devendo, portanto, serem estocadas até sua utilização (SIRARD, 2001).

Como grande parte dos transcritos será consumida, principalmente, nos últimos eventos citados acima, 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 RNAm 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 RNAm em partículas

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

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). Uma das maiores causas de falha na maturação oocitária é o armazenamento, processamento e recrutamento inapropriado da cauda poli-(A) do RNAm materno (BREVINI GANDOLFI *et al.*, 1997).

Poliadenilação

Inúmeros mecanismos estão envolvidos na ativação do RNAm traducionalmente dormente (BROWN AND 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 AND SCHORDERET-SLATKINE, 1997; FAN & 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 RNAm 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 RNAm para a formação da cauda poli-(A)-3'. O transporte desse RNAm para o citoplasma é feito através de um encurtamento característico da cauda poli-(A) (*splicing*) que, ao alcançar tal compartimento, torna-se menor e heterogêneo no tamanho (JACKSON AND STANDART, 1990; TOMEK *et al.*, 2002). Sabe-se que quando as moléculas de RNAm 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 RNAm, no citoplasma do oócito durante a maturação, leva à tradução das proteínas e a deadenilação, por sua vez, leva à degradação desse RNAm.

Os principais transcritos produzidos durante a maturação molecular do oócito, são, entre outros, os reguladores do ciclo celular: ciclina B, p34^{cdc2}, MPF, MOS e MAPK; inúmeros RNAs como, por exemplo, os de receptores de FSH, LH e

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

Conexina 43 (Cx43) (CALDER *et al.*, 2003); as proteínas e moléculas marcadoras de maturação citoplasmática, como a glutathione (ALI *et al.*, 2003) e moléculas de ATP (STOJKOVIC *et al.*, 2001); e os componentes do sistema enzimático antioxidante catalase, superóxido dismutase e glutathione 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 proteínas *de novo* (LEVESQUE & SIRARD, 1996; TREMBLAY *et al.*, 2005). A maioria das proteínas envolvidas nesse processo é sintetizada nas primeiras horas de cultivo *in vitro* e a ciclina B1 é uma delas (TREMBLAY *et al.*, 2005). O RNAm da isoforma de ciclina B1, ciclina B1L, é estocado com uma cauda poli-(A) curta, em uma forma traducionalmente inativa e o acúmulo desse transcrito leva a uma grande poliadenilação citoplasmática e, conseqüentemente à tradução e síntese da proteína ciclina B1 mesmo antes da MIV, sendo esta acumulada e detectada no citoplasma do oócito 3h após o início da maturação *in vitro* (LEVESQUE & SIRARD, 1996; TREMBLAY *et al.*, 2005). A proteína quinase p34^{cdc2} tem um padrão semelhante de início de tradução apresentado pela ciclina B1 (STEBBINS-BOAZ *et al.*, 1996) e, ao ser desfosforilada pela cdc25, une-se à referida ciclina, formando o Fator Promotor de Maturação (MPF), que dará início à retomada meiose (FAN *et al.*, 2004).

A proteína MOS, produto do proto-oncogene c-MOS, é codificada também por um RNAm materno, estocado durante o crescimento do oócito. Durante o período de maturação, esse RNAm é traduzido e degradado, juntamente com outros RNAs em fases posteriores do desenvolvimento, de acordo com a espécie estudada. A proteína MOS ativa a cascata da Proteína Quinase Ativadora de Mitógeno (MAPK), que modula a atividade do MPF e leva à entrada no ciclo celular (transição da fase G2 para a fase M) (BREVINI GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). Em oócitos bovinos, a ativação do MPF e da MAPK ocorre simultaneamente por volta de 6h de cultivo *in vitro*, antes da quebra da vesícula germinativa (8h após o início da MIV) (FISSORE *et al.*, 1996). Assim, a síntese e armazenamento apropriados desses transcritos no citoplasma do oócito serão cruciais também para a continuidade dos eventos nucleares de retomada e progressão da meiose.

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

Outros RNAs envolvidos na aquisição de competência para o desenvolvimento

Outros transcritos codificados durante a maturação do oócito somam-se aos aqui listados em função do equilíbrio e coordenação dos eventos celulares envolvidos na aquisição de competência como um todo. As gonadotropinas têm um papel primordial de coordenação fisiológica e, por isso, RNAs que codificam receptores de FSH, LH (FSHr e LHR) e conexina 43 (Cx 43) 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, em particular, está envolvida no crescimento folicular e seu RNA e proteína estão presentes durante a maturação de COCs bovinos (MODINA *et al.*, 2001). Os RNAs 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 RNAs codificando tais proteínas dependem do tempo de maturação e da qualidade do oócito (CALDER *et al.*, 2003).

Marcadores de maturação citoplasmática e sistema enzimático antioxidante

Além dos reguladores do ciclo celular, outras moléculas fundamentais para o 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 & FURNUS, 2000), através da eliminação das ROS 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 MII (MIYAMURA *et al.*, 1995; ALI *et al.*, 2003) e, após a

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

fertilização, sua atividade relaciona-se à descondensação da cromatina espermática, com consequente ativação do oócito e, também, à transformação da cabeça do espermatozóide em pronúcleo masculino (De MATOS & FURNUS, 2000). A síntese de glutathione durante a maturação *in vitro* parece depender da disponibilidade de cisteína no meio de cultura (FURNUS & DE MATOS, 1999). Assim, se o meio utilizado na MIV for deficiente nesse precursor, a síntese de glutathione será afetada por insuficiência de substrato e os oócitos serão cultivados em condições sub-ótimas, resultando em um desenvolvimento embrionário insatisfatório (De MATOS & FURNUS, 2000; ALI *et al.*, 2003). Além da glutathione, 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 MIV para 2.3-2.5 pmol após a maturação, com reflexo positivo também no desenvolvimento embrionário inicial (STOJKOVIC *et al.*, 2001).

Juntamente com a glutathione, outras moléculas do sistema enzimático antioxidante têm um importante papel atenuante dos efeitos deletérios do estresse oxidativo provocado pelas ROS (CETICA *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase estão presentes em oócitos bovinos e células do *cumulus* após a MIV. 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 ROS ($P > 0,05$) (CETICA *et al.*, 2001).

Considerações finais

As modificações estruturais e bioquímicas aqui descritas quanto à redistribuição das organelas, à dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular, que têm início ainda na fase de crescimento e se completam com a progressão do desenvolvimento, como consequência direta da maturação citoplasmática do oócito, 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

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

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-chaves que compõem a fascinante biologia do oócito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, D.F. (1992) Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. **Mut Res**, 296:57-68.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2004) **Biologia molecular da célula**. Tradução de Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.* – 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 907-908; 923; 1044-1045.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.

BREVINI GANDOLFI, T.A.L.; CILLO, S.; MODINE, S.; GANDOLFI, F. (1997) Defective developmental capacity of bovine oocytes is accompanied by a shorter poly(A) tail of maternal transcripts. **J. Reprod. Fertil.**, 19:41-42.

BREVINI GANDOLFI, TAL & GANDOLFI, F. (2001) The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, 55:1255-1276.

BROWN, E.J.; SCHREIBER, S.L. (1996) A signaling pathway to translational control. **Cell**, 86:517-520.

CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SIRARD, M.A., WATSON, A.J. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocytes complexes during maturation *in vitro*. **Fertility & Sterility**, v.83, n.1, p.1077-1085, 2005.

CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C; WATSON, A.J. (2003) Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor

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

and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. **Reprod Biol Endocr**, 1:1-12.

CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T. (2001) Antioxidant enzyme activity and oxidative stress on bovine oocyte *in vitro* maturation. **IUBMB Life**, 51(1):57-64.

COLGAN, D.F.; MURTHY, K.G.K.; PRIVES, C.; MANLEY, J.L. (1996) Cell-cycle related regulation of poli-(A) polymerase by phosphorylation. **Nature**, 384:282-285.

CONNER, S.; LEAF, D.; WESSEL, G.M. (1997) Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. **Mol Reprod Dev**, 48(1):106-18, Sep.

COUTTET, P. FROMONT-RACINE, M.; STEEL, D.; PICTET, R.; GRANGE, T. (1997) Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94:5628-5633.

CUMMINS, J.M. (2004) The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 115(1):S23-S29.

DAVIDSON, E.H. (1986) Gene activity in early development. **Academic Press, New York**, 642p.

DE MATOS, D.G. & FURNUS, C.C. (2000) The importance of having high glutathione level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, 53: 761-771.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; LONERGAN, P.; BOLANDO, M.P. (2001) Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. **Biol Reprod**, 64:1516-1525.

FAN, H.Y. & SUN, Q.Y. (2004) Involvement of MAPK cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biol Reprod**, 70:535-547.

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

FULKA JR, J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. (1998) Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Mol Hum Reprod**, 4(1):41-49.

FURNUS, C.C. & MATOS, D.G. (1999) The availability of cyteine in culture medium appers to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. **Theriogenology**; 51: 373 abstr.

GAVIN, A.C. & SCHORERET-SLATKINE, S. (1997) Ribosomal S6kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylation correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation in mouse oocytes. **Mol Reprod Dev**, 46:383-391.

HALEY, S.A. & WESSEL, G.M. (2004) Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Mol Cell Biol**, 15(5):2084-2092, May.

HERRICK, J.R.; BRAD, A.M.; KRISHER, R.L.; POPE, W.F. (2003) Intracelullar adenosine triphosphate and glutathione concentrations in oocyets from first estrous and testosterone-treated gilts. **An Reprod Scie**, 78:123-131.

HOSOE, M. & SHIOYA, Y. (1997) Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, 5(4):371-376, Nov.

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

HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S.; GREVE, T. (1986) Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, 78:615-625.

HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAUNRICIK, J.; THOMSEN, P.D.; CALLESEN, H.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; DIELEMAN, S.J.; SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U.; GREVE, T. (2001) Ribossomal RNA gene expression and
¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP/USP – Ribeirão Preto, SP.

chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, 122:21-30.

KLINE, D. (2000) Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Curr Top Dev Biol**, 50:125-154.

KRISHER, R.L. & BAVISTER B.D. (1998) Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, 49:103-114.

KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. (1983) Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. **Gametes Res.**, 8:29-47.

JACKSON, R.J. & STANDART, N. (1990) Do poly-(A) tail and 3'untranslated region control mRNA translation? **Cell**, 62:15-24.

JONES, K.T. Turn it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v.10, n.1, p.1-5, 2004.

JONES, K.T.; CARROL, J.; MERRIMAN, J.A.; WITTINGHAM, D.G.; KONO, T. (1995) Repetitive sperm-induced Ca²⁺ transients in mouse oocytes are cell cycle-dependent. **Development**, 121:3259-3266.

KRUIP, T.A.M.; CRAN, D.G.; VAN BENEDEN, T.H.; DIELEMAN, S.J. (1983) Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. **Gametes Res.**, 8:29-47.

LI, G-P.; LIU, Y.; BUNCH, T.D.; WHITW, K.L.; ASTON, K.I. (2005) Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase II to metaphase III. **Mol Reprod Dev**, 71:220-226.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T.H.; HIRSHBERG, K. (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **An Rew Cell Dev Biol**, 16:557-589.

LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. (2000) Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biol Reprod**, 62:1745-1753.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; FUENTE, J.D.; BOLAND, M. (2000) 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**, 57:146-152.

LU, D.P.; TIAN, L.; O'NEILL, C.; KING, N.J. (2002) Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes, peri-implantation and post-implantation embryos. **Cell Res**, 12:373-383.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F., MERIGHE, G.K., GARCIA, S.M. (2004) Genome activation and developmental block in bovine embryos. **An Reprod Sci**, 82-83:13-20.

MENDEZ, R. & RICHTER, J.D. Translational control by CPEB: a means to the end. **Molecular Cell Biology**, v.2, p.521-529, 2001.

MERIC, F.; SEARFOSS, A.M.; WORMINGTON, M.; WOLFFE, A.P. (1996) Masking and unmasking maternal mRNA. The role of polyadenylation, splicing and nuclear history. **J Biol Chem**, 48:30804-308010.

MODINA, S.; LUCIANO, A.M.; VASSE, R.; BARALDI-SCESI, L.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. (2003) 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**, 106: 241-148.

MORENO, R.D.; SCHATTEN, G.; RAMALHO-SANTOS, J. (2002) Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte *in vitro* maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. **Biol. Reprod.**, 66:1259-1266.

MYIAMURA, Y; YOSHIDA, M.; HAMANO, S; KUWAYAMA, M. (1995) Glutathione concentration during maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**; 43: 282 abstr.

NOHL, H.; GILLE, L.; STANIEK, K. (2005) Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Biochem Pharmacol**, 69:719-723, Jan.

PAYNE, C. & SCHATTEN, G. (2003) Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Dev. Biol.**, 264:50-63.

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 to Cells**, v.10, p.627-638, 2005.

SHIM, C.; LEE, S.G.; SONG, W.K.; LEE, C.S.; LEE, K.K.; KIM, L. (1997) Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. **Mol Reprod Dev**, 48:185-193.

SIRARD, M.A. (2001) Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, 55:1241-1254.

LEVESQUE, J.T. & SIRARD, M.A. (1996) Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B1 in bovine oocytes. **Biol Reprod**, 55:1427-1436.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES P.B.; WOLF, E. (2001) 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.**, 64(3):904-909, Mar.

STRICKER, S.A. (2006) Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. **Seminars in Cell Development Biology**, 17:303-313.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUES, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. (2006) Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reprod Dom Anim**, 41: 5-11.

THACH, R.E. (1992) Cap recap: the involvement of the eIF-4F in regulating gene expression. **Cell**, 68:177-180.

THIBAUT, D.; SZOLLOZI, D.; GÉRARD, M. (1987) Mammalian oocyte maturation. **Reprod Nutr Dev**, 27:865-896.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. (2002) Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reprod Dom Anim**, 37:86-91.

TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; SIRARD, M.A. (2005) Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. **Biol Reprod**, 72:1037-1044.

TRIMARCHI, J.R.; LIU, L.; PORTEFIELD, D.M.; SMITH, P.J.; KEEFE, D.L. (2000) Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. **Biol Reprod**, 62:1866-1874.

WESSEL GM, BROOKS JM, GREEN E, HALEY S, VORONINA E, WONG J, ZAYDFUDIM V, CONNER S. (2001). The biology of cortical granules. **Int Rev Cytol.**, 209:117-206.

WESSEL GM, CONNER SD, BERG L. (2002) Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the *sea urchin* oocyte. **Development**, 126:4315-4325.