

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(2): 85-90, 2018.

DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2018.2.1

## LA ATPASA6 PARTICIPA EN LA MADURACIÓN DE OVOCITOS DE CERDO *IN VITRO*

Fabiola Chong<sup>1</sup>, Iván Bahena<sup>2</sup>, Eduardo Casas<sup>2</sup>, Miguel Betancourt<sup>2</sup>, Yvonne Duclomb<sup>2</sup>, Cristina González<sup>2</sup>, Pedro Cuapio<sup>3</sup> y Edmundo Bonilla<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Mérida, Yucatán. Laboratorio de Biología y Cultivo de Moluscos del Departamento de Recursos del Mar. Km. 6 Antigua carretera a Progreso Apdo. Postal 73, Cordemex, C.P. 97310, Mérida, Yucatán, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud. Av. San Rafael Atlixco #186, Col. Vicentina, Deleg. Iztapalapa, C.P. 09340, Ciudad de México, México. <sup>3</sup>Clínica de Reproducción Asistida "HISPAREP", Hospital Español. Avenida Ejército Nacional #613, Col. Granada, Deleg. Miguel Hidalgo, C.P. 11520, Ciudad de México, México. \*E-mail: mundo@xanum.uam.mx

### RESUMEN

La maduración del ovocito en los folículos preovulatorios comprende complejos eventos regulados en parte por gonadotropinas. Sin embargo, para entender estos eventos, es necesario identificar los diferentes genes que participan en la maduración. Uno de estos genes corresponde a la proteína ATPasa6, componente de la ATP sintasa que se sobreexpresa durante la maduración de los ovocitos, pero hasta ahora, no ha sido comprobada su participación experimentalmente. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio se encaminó a determinar si la ATPasa6 tiene un papel relevante en la maduración de los ovocitos del cerdo, a partir de la conformación de dos grupos de ovocitos: El experimental microinyectados con un RNA interferente para ATPasa6, silenciando su expresión, y el grupo control microinyectados con un RNAi para un gen de invertebrado. Después de la microinyección, ambos grupos se cultivaron *in vitro* durante 48 h en medio de maduración. El grupo microinyectado con siRNA para ATPasa6 mostró una disminución del 71% en la expresión de este gen a las 24 h de incubación, en tanto que el porcentaje de ovocitos maduros en este grupo disminuyó 51.1% (67.5% en el grupo control vs 33% en el grupo tratado con ATPasa6-RNAi;  $p < 0.05$  con *t* de Student). Estos resultados permiten concluir que la ATPasa6 juega un papel importante durante la maduración de los ovocitos del cerdo.

**Palabras Clave:** ATPasa6, cerdo, maduración, ovocito, RNA interferente.

### ATPase6 participates in pig oocyte maturation *in vitro*

### ABSTRACT

Oocyte maturation involves several complex events which are partially regulated by the gonadotropins. However, in order to fully understand these events it is necessary to identify all those genes with roles in maturation. One of these genes is the protein ATPase6, which is a component of ATP synthase and is upregulated during oocyte maturation, nevertheless, its participation has not been experimentally evaluated. Therefore, the aim of the present study was to determine if ATPase6 has a relevant role in pig oocyte maturation, by conforming two groups of oocytes: The experimental, oocytes microinjected with ATPase6-interfering RNA (RNAi) in order to silence its expression, and the control, oocytes microinjected with an invertebrate gene-RNAi. After microinjection, both groups of oocytes were cultured in maturation medium for 48 h. ATPase6 expression was reduced 71% in ATPase6-RNAi microinjected oocytes, while the percentage of matured oocytes was reduced 51% in this group (67.5% in control oocytes vs 33% in ATPase6-RNAi microinjected oocytes;  $p < 0.05$  with Student's *t* test). These results allow us to conclude that ATPase6 has an important role in the maturation of pig oocytes.

**Key Words:** ATPase6, pig, maturation, oocyte, interfering RNA.

## INTRODUCCIÓN

La maduración del ovocito de mamíferos es un proceso complejo y multifactorial que se inicia alrededor de la pubertad con el estímulo hormonal. Esta maduración del ovocito comprende una serie de cambios a nivel del núcleo, de la membrana plasmática y citoplásmicos que resultan en la formación de un óvulo capaz de ser fertilizado (Dalton *et al.*, 2014).

El conocimiento de que altos niveles de AMPc participan como un factor inhibitorio en la maduración del ovocito (Conti *et al.*, 2002; Duckworth *et al.*, 2002; Kalinowski *et al.*, 2004) y que el estímulo de la hormona luteinizante (LH) durante la pubertad es causante de la expansión y ruptura de las uniones comunicantes durante la maduración del ovocito (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2000; Mehlmann, 2005), son algunos factores involucrados en este proceso, sin embargo, la participación de genes asociados con la maduración de ovocitos es muy limitada por ejemplo, la inhibición de la DNA metil transferasa 1 (Dnmt1) conduce a una disminución en el contenido del glutatión, en el número de mitocondrias, en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y en la distribución de los gránulos corticales (Huan *et al.*, 2015); por su parte, la disminución de la expresión de RhoA en ovocitos causó fallas en la extrusión del cuerpo polar y el desarrollo embrionario (Zhang *et al.*, 2014). En contraste a ellos, el silenciamiento de GPR3 elevó los porcentajes de maduración de los ovocitos, indicando que GPR3 es un regulador negativo de la maduración (Yang *et al.*, 2012).

Por su parte el empleo de “modelos animales” como la generación de ratones nulos para genes específicos, también ha permitido la identificación de genes esenciales en la maduración, entre los que se encuentra *TAF4b*; ratones nulos para este gen producen ovocitos rodeados con un escaso número de células

del *cumulus*, con bajas tasas de maduración y que, aún en el caso de ser fertilizados, se quedan detenidos como embriones de dos células (Falender *et al.*, 2005).

Por otro lado, Cui *et al.*, (2005) analizaron la expresión génica durante la maduración de los ovocitos del cerdo, identificando 13 incluido el gen *ATPasa6* (ATP sintasa F0, subunidad 6), que forma parte de la ATP sintasa de la cadena respiratoria mitocondrial, responsable de fosforilar el ADP, para formar ATP con ayuda del gradiente de protones generado durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria (Grover *et al.*, 2008) (Figura 1). Sin embargo, en el terreno reproductivo, se desconoce el papel de la *ATPasa6* y en particular en la maduración de ovocitos. A este respecto se ha identificado que el polimorfismo de este gen en espermatozoides humanos está asociado con problemas en la fertilización *in vitro* (Mao *et al.*, 2015). Por otro lado, una mutación en la *ATPasa6* y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno están relacionados con insuficiencia ovárica prematura humana (Venkatesh *et al.*, 2010). Estos datos, aunados al hecho de que la *ATPasa6* incrementa su expresión durante la maduración de los ovocitos del cerdo y a la importancia de la producción de ATP en la regulación de la maduración y desarrollo embrionario (Harris *et al.*, 2009) sugieren que puede tener un papel fundamental en este proceso. Sin embargo, esto a la fecha no ha sido probado. Por lo tanto, el objetivo de este estudio se encaminó a determinar el papel de la *ATPasa6* en la maduración de los ovocitos del cerdo *in vitro*, mediante su silenciamiento con RNA interferente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Sigma (Sigma chemical Company, St Louis, MO EUA). Los reactivos y las soluciones se esterilizaron mediante filtración con membranas de 0.22 µm Millex-GV (Millipore). Todas las técnicas se realizaron

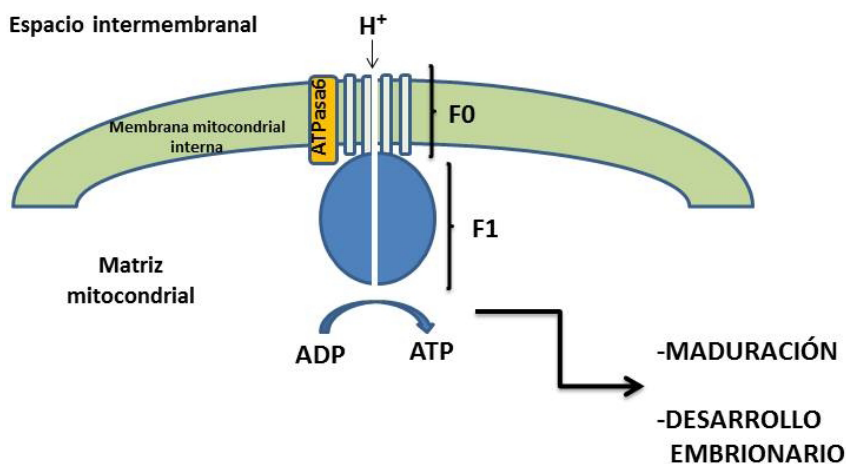


Figura 1. Esquema de la ATP sintasa o complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial. Se muestran las subunidades F0 y F1 que la conforman, así como la *ATPasa6*, componente de F0. La formación de ATP por la ATP sintasa es un regulador de la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario (ver texto).

bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Veco, México). Los procedimientos de Maduración *in vitro* (MIV) se realizaron cubriendo con aceite mineral.

### Diseño experimental

Para determinar si la ATPAsa6 tiene un papel en la maduración de los ovocitos del cerdo *in vitro*, se formaron dos grupos de estudio:

- 1) Grupo control, ovocitos microinyectados con RNAi para un gen de invertebrado, por tanto sin homología con algún gen de vertebrado (20 ovocitos por experimento).
- 2) Grupo experimental, ovocitos microinyectados con RNAi para ATPAsa6 (20 ovocitos por experimento).

Los niveles de expresión de la ATPAsa6 y de un gen constitutivo,  $\beta$ -actina, se analizaron al inicio de la maduración (t0) así como a las 24 y 48h de maduración. El efecto inhibitorio de la maduración se enfocó específicamente a las 24 h, cuando el RNAi tiene su máxima actividad inhibitoria, ya que posteriormente es degradado por la célula.

Tanto en el grupo control como en el experimental se analizó la progresión de la meiosis de los ovocitos al t0 y después de 44 h de incubación en “medio de maduración”, se identificaron ovocitos en estadio de vesícula germinal, metafase I o metafase II. Los experimentos se realizaron por triplicado en diferentes días.

### Obtención y maduración de ovocitos porcinos

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos porcinos se realizó de acuerdo con el método reportado por Casas *et al.*, 2010. Se colectaron ovarios de cerdas prepúberes en el rastro, justo después de que los animales fueron sacrificados. Los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina 0.9% a 38°C.

Los ovocitos rodeados por células del *cumulus* (COCs) se recuperaron del fluido folicular por punción con jeringa de 10 mL y aguja de 18G X 38 mm a partir de folículos de 3 a 6 mm de diámetro y se dejaron sedimentar, posteriormente fueron lavados con medio TL- HEPES-PVA. Bajo el microscopio se seleccionaron aquellos COCs en los que los ovocitos aparecían rodeados por una masa folicular compacta y presentaban un citoplasma granular uniforme. Estos COCs fueron lavados 3 veces en “medio de maduración” TCM-199 con bicarbonato y sales de Earle (In Vitro México) suplementado con PVA 0.1%, glucosa 3.05 mM y piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y Factor de crecimiento epidérmico de glándula submaxilar de ratón (10 ng/mL, Sigma) para posteriormente colocar de 30 a 35 COCs por pozo en una gota de 500  $\mu$ L con el mismo medio y suplementado con las hormonas Foliculo estimulante y Luteinizante de hipófisis porcina (0.5  $\mu$ g/mL, Sigma). El medio se equilibró previamente con CO<sub>2</sub> al 5% en una incubadora a 38.5 °C y humedad a saturación. Se dejaron madurar 48 horas en incubación en las mismas condiciones.

### Microinyección de los ovocitos con RNAi

Las células de la granulosa fueron removidas de los COCs inmediatamente después de su recolección mediante su incubación con hialuronidasa al 1% durante 5 minutos a 37°C. Los ovocitos desnudos se colocaron en gotas de 3 mL de medio TL-HEPES en una caja de Petri y se cubrieron con aceite mineral. En cada experimento se formaron dos grupos (Experimental y Control): los ovocitos del grupo experimental fueron inyectados con 65 pL de Stealth RNAi 45-2001 (Invitrogen) para ATPAsa6, en tanto que los del grupo control fueron microinyectados con un RNAi de invertebrado, sin presentar complementariedad con RNAm de vertebrados. Después de la microinyección, los ovocitos fueron incubados 48 h en medio TCM-199 bajo las condiciones mencionadas previamente.

### Evaluación de la maduración de ovocitos mediante tinción con Hoechst

Posterior a la tinción con MTT y para remover el exceso de éste, los ovocitos se lavaron en gotas de 500  $\mu$ L de PBS, se colocaron en otra caja, se cubrieron con 200  $\mu$ L de Hoechst (3342) (45  $\mu$ g/mL) en PBS, dejándolos durante 45 minutos en la oscuridad a 4°C. Posteriormente se lavaron en gotas de 500  $\mu$ L de PBS, resuspendiendo de 2 a 3 veces para eliminar el exceso de Hoechst, y se colocaron en otra caja con 500  $\mu$ L de fijador con PBS (glutaraldehído 50  $\mu$ L/5mL), durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Después, aproximadamente 15 ovocitos se transfirieron a un portaobjetos con 20  $\mu$ L de medio de montaje (Glicerol-PBS 7:3), se colocó el cubreobjetos y se selló para su observación. La evaluación de la maduración de los ovocitos se llevó a cabo a 400 aumentos, utilizando un microscopio Zeiss, modelo Axioscop y filtro de fluorescencia con rango de excitación para luz ultravioleta (482 nm).

De acuerdo a las características observadas los ovocitos se clasificaron en: Inmaduros para aquellos que mostraron vesícula germinal (VG), en vías de maduración con cromosomas en Metafase I (MI) y Maduros para aquellos con cromosomas y primer cuerpo polar en extrusión Metafase II (MII) (Casas *et al.*, 2010).

### Ensayos de retrotranscripción y PCR

El RNA de ambos grupos de ovocitos se extrajo utilizando un estuche comercial de Promega. La retrotranscripción se llevó a cabo a 42° C durante 50 min. utilizando cebadores al azar y la enzima Superscript II (GibcoBRL). Los cebadores utilizados para amplificar por PCR a la ATPAsa6 fueron los reportados por Cui *et al.*, (2005), con las secuencias ATPAsa6 F: 5'-CACCAAAAGGACGAACATGA-3' y ATPAsa6 R: 5'-TTCCTTGTTGGAAGGAAGTGG-3'. Las secuencias de los cebadores de *b*-Actina usadas como control, son: *b*-Actina F: 5'- ATGGTGGGTATGGGTCAGAA-3' y *b*-Actina R: 5'-CGGAGCTCGTTGTAGAAGGT-3'. La PCR se llevó a cabo durante 25 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s y 74°C por 1 min utilizando la enzima Taq DNA polimerasa de Promega.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio.

### Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en diferentes días. La prueba t de Student se usó para evaluar las diferencias entre los grupos, que fueron consideradas significativas con  $p < 0.05$ . El programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) se utilizó para llevar a cabo los análisis estadísticos.

### RESULTADOS

La Figura 2 muestra el perfil de expresión de la ATPasa6 en ovocitos de cerdo madurados *in vitro* durante 48 h. La expresión de la ATPasa6 en ovocitos microinyectados con un RNAi de invertebrado (control) fue evidente desde el inicio de la maduración (tiempo 0, t0), su expresión continuó aumentando desde las 24 h, siendo un incremento significativo únicamente hasta las 48 h ( $p < 0.05$  con t de Student).

La Figura 3 muestra el efecto del RNAi para la ATPasa6 en ovocitos. La expresión de la ATPasa6 disminuyó 71% (habiendo asignado al valor densitométrico de ATPasa6 en el grupo control un valor de 1) a las 24 h, cuando se comparó con aquellos ovocitos que recibieron únicamente el RNAi de invertebrados ( $p < 0.05$  con t de Student).

El análisis de la maduración de los ovocitos a las 48 h después del silenciamiento de la ATPasa6 indicó que el 62.5% de los que fueron microinyectados con RNAi lograron continuar con la

meiosis hasta la metafase I y sólo el 33% alcanzó la metafase II, en contraste, el 67.5% de los del grupo control alcanzaron la metafase II de la meiosis, lo que corresponde a una disminución significativa del 51.1% ( $p < 0.05$  con t de Student; Figura 4).

### DISCUSIÓN

El presente estudio se encaminó a evaluar la participación de la ATPasa6 sobre la maduración *in vitro* de ovocitos utilizando como modelo el ovocito de cerdo. Los resultados mostraron que la expresión de la ATPasa6 fue silenciada en un 71% en aquellos que recibieron el RNAi para este gen. Este silenciamiento de la ATPasa6 tuvo un impacto negativo sobre la maduración de los ovocitos, pues aunque el 62.5% de los ovocitos microinyectados con RNAi para ATPasa6 fueron capaces de progresar en la meiosis hasta la metafase I, únicamente el 33% de los ovocitos pudo alcanzar el estadio de metafase II.

La inhibición de la ATP sintasa, responsable de fosforilar el ADP para formar ATP (Grover *et al.*, 2008) y vía canónica de regulación de la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano hasta el estadio de blastocisto (Harris *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017), probablemente afectó la producción de ATP dentro del ovocito, lo que pudo causar que sólo el 33% de los tratados con el RNAi para la ATPasa6 alcanzaran la etapa de metafase II. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la ATP sintasa esté involucrada en otras vías metabólicas dentro del ovocito, por ejemplo, estudios recientes muestran que este complejo, puede regular la diferenciación celular participando

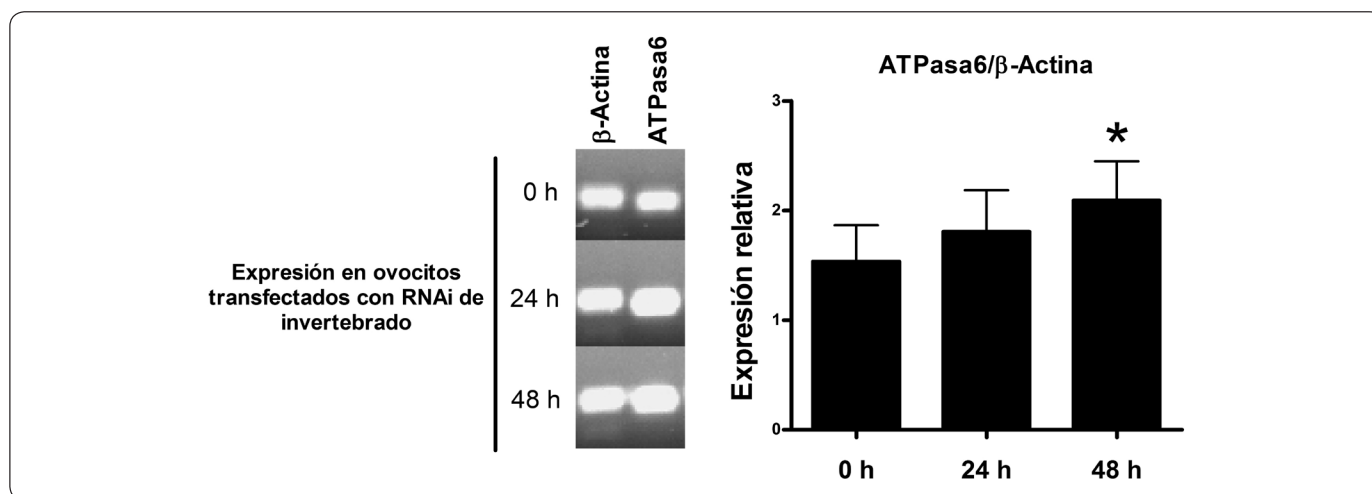
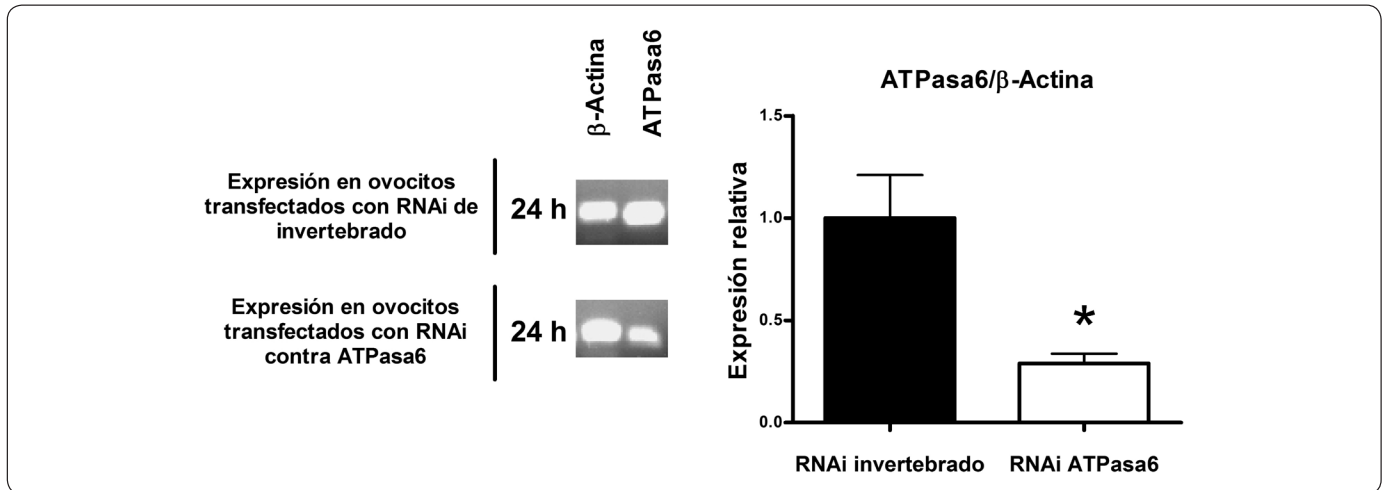
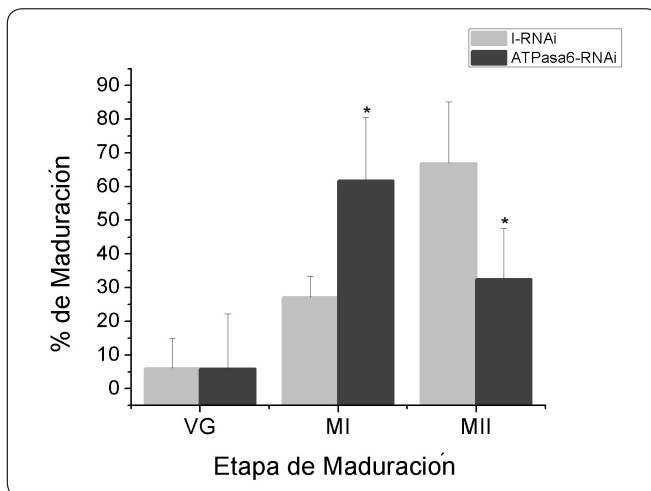


Figura 2. Patrón representativo de expresión de la ATPasa6 durante la maduración *in vitro* de los ovocitos del cerdo. A) La expresión de ATPasa6 y de β-actina (control de carga) en cada ovocito de cerdo se analizó mediante RT-PCR a las 0, 24 y 48 h de maduración. En cada tiempo de maduración se analizaron 10 ovocitos por experimento. Los amplicones se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 2 % y las bandas correspondientes fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio. B) Gráfica de la densitometría realizada a los amplicones de ATPasa6 y β-actina. Los valores de ATPasa6 fueron normalizados en relación a los de β-actina y se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Se observa un aumento de ATPasa6 en la maduración que es significativo a las 48h. Los experimentos se realizaron por triplicado en diferentes días. \*Diferencia significativa con respecto al Control al tiempo 0,  $p < 0.05$  con t de Student.



**Figura 3.** Silenciamiento de la ATPAsa6 en ovocitos de cerdo madurados *in vitro*. A) Cada ovocito fue microinyectado con RNAi para la ATPAsa6 (Experimento) o RNAi de invertebrado (Control) y después incubados en medio de maduración. La expresión de la ATPAsa6 y de  $\beta$ -actina fue analizada a las 24h mediante RT-PCR (10 ovocitos por cada tiempo y experimento). Los amplicones se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 2 % y las bandas correspondientes fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio. B) Gráfica de la densitometría realizada a los amplicones de la ATPAsa6 y  $\beta$ -actina. Los valores de la ATPAsa6 fueron normalizados en relación a los de  $\beta$ -actina y se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar. En los ovocitos microinyectados con RNAi para la ATPAsa6 se observa una disminución significativa de la expresión de la ATPAsa6. Los experimentos se realizaron por triplicado en diferentes días. \*Diferencia significativa con respecto al control,  $p < 0.05$  con t de Student.



**Figura 4.** Análisis del efecto del silenciamiento de la ATPAsa6 sobre la maduración de ovocitos de cerdo *in vitro*. A) Los ovocitos fueron microinyectados con RNAi para la ATPAsa6 (Experimento) o RNAi de invertebrado (Control) y fueron incubados en medio de maduración. A las 48 horas se analizó el porcentaje de ovocitos inmaduros (estadio de vesícula germinal, VG), en metafase I (MI) o metafase II (MII). Se usaron 20 ovocitos por grupo por experimento. Los experimentos se realizaron por triplicado en diferentes días. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar. A las 48 h, la maduración de ovocitos (MII) microinyectados con RNAi para ATPAsa6 (ATP-RNAi) es significativamente menor que el RNA de invertebrado usado como control (I-RNA). \*Diferencia significativa con respecto al control,  $p < 0.05$  con t de Student.

en la maduración de las invaginaciones de la membrana interna mitocondrial, las llamadas crestas mitocondriales (Walker, 2013; Teixeira *et al.*, 2015). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar si el bloqueo en la maduración de los ovocitos de los mamíferos por el silenciamiento de la ATPAsa6 se basa en el efecto sobre las crestas mitocondriales del ovocito y de las células del *cumulus* que soportan su crecimiento y diferenciación.

## CONCLUSIONES

Con estos resultados preliminares se sugiere que la ATPAsa6 sí tiene un papel importante en la maduración de los ovocitos del cerdo, ya que la inhibición de su expresión mediante RNAi causa una inhibición significativa ( $p < 0.05$  con t de Student) durante el proceso de maduración.

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto parcialmente apoyado por CONACYT, 0105961-M.

## REFERENCIAS

- Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y. & Betancourt, M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*, **24**, 224-230. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.09.004.
- Conti, M., Andersen, C.B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S.Y., Horner, K., Jin, C. & Tsafiri, A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol. Cell Endocrinol.*, **187**, 153-159.



- Cui, X.S., Song, H. & Kim, N.H. (2005). Identification of metaphase II-specific gene transcripts in porcine oocytes and their expression in early stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, **17**, 625-631.
- Dalton, C.M., Szabadkai, G. & Carroll, J. (2014). Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *J. Cell Physiol.*, **229**, 353-361. DOI: 10.1002/jcp.24457.
- Duckworth, B.C., Weaver, J.S. & Ruderman, J.V. (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase. A. *PNAS*, **99**, 16794-16799.
- Falender, A.E., Shimada, M., Lo, Y.K. & Richards, J.S. (2005). TAF4b, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function. *Dev. Biol.*, **288**, 405-419.
- Grover, G.J., Marone, P.A., Koetznner, L. & Seto-Young, D. (2008). Energetic signalling in the control of mitochondrial F1F0 ATP synthase activity in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 2698-2701. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.06.013.
- Harris, S.E., Leese, H.J., Gosden, R.G. & Picton H.M. (2009). Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, **76**, 231-238. DOI: 10.1002/mrd.20945.
- Huan, Y., Xie, B., Liu, S., Kong, Q. & Liu, Z. (2015). A novel role for DNA methyltransferase 1 in regulating oocyte cytoplasmic maturation in pigs. *PLoS One*, **10**, e0127512. DOI: 10.1371/journal.pone.0127512.
- Kalinowski, R.R., Berlot, C.H., Jones, T.L., Ross, L.F., Jaffe, L.A. & Mehlmann, L.M. (2004). Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev. Biol.*, **267**, 1-13.
- Kanatsu-Shinohara, M., Schultz, R.M. & Kopf, G.S. (2000). Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34cdc2, cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol. Reprod.*, **63**, 1610-1616.
- Koyama, K., Kang, S.S., Huang, W., Yanagawa, Y., Takahashi, Y. & Nagano, M. (2014). Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *J. Reprod. Dev.*, **60**, 136-142.
- Lee, M., Ahn, J.I., Lee, A.R., Ko, D.W., Yang, W.S., Lee, G., Ahn, J.Y. & Lim, J.M. (2017). Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes. *Mol. Cells* **40**, 558-566. DOI: 10.14348/molcells.2017.0058.
- Mao, G.H., Wang, Y.N., Xu, M., Wang, W.L., Tan, L. & Tao, S.B. (2015). Polymorphisms in the MT-ATP6 and MT-CYB genes in *in vitro* fertilization failure. *Mitochondrial DNA* **26**, 20-24. DOI: 10.3109/19401736.2013.840612.
- Mehlmann, L.M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, **130**, 791-799.
- Teixeira, F.K., Sánchez, C.G., Hurd, T.R., Seifert, J.R., Czech, B., Preall, J.B., Hannon, G.J. & Lehmann, R. (2015). ATP synthase promotes germ cell differentiation independent of oxidative phosphorylation. *Nat. Cell Biol.*, **17**, 689-696. DOI: 10.1038/ncb3165.
- Venkatesh, S., Kumar, M., Sharma, A., Kriplani, A., Ammini, A.C., Talwar, P., Agarwal, A. & Dada, R. (2010). Oxidative stress and *ATPase6* mutation is associated with primary ovarian insufficiency. *Arch. Gynecol. Obstet.*, **282**, 313-318. DOI: 10.1007/s00404-010-1444-y.
- Walker, J.E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1-16. DOI: 10.1042/BST20110773.
- Yang, C.R., Wei, Y., Qi, S.T., Chen, L., Zhang, Q.H., Ma, J.Y., Luo, Y.B., Wang, Y.P., Hou, Y., Schatten, H., Liu, Z.H. & Sun QY. (2012). The G protein coupled receptor 3 is involved in cAMP and cGMP signaling and maintenance of meiotic arrest in porcine oocytes. *PLoS One*, **7**, e38807 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0038807.
- Yuan, B., Liang, S., Kwon, J.W., Jin, Y.X., Park, S.H., Wang, H.Y., Sun, T.Y., Zhang, J.B. & Kim, N.H. (2016). The Role of Glucose Metabolism on Porcine Oocyte Cytoplasmic Maturation and Its Possible Mechanisms. *PLoS One*, **11**:e0168329. DOI: 10.1371/journal.pone.0168329.
- Zhang, Y., Duan, X., Cao, R., Liu, H.L., Cui, X.S., Kim, N.H., Rui, R. & Sun, S.C. (2014). Small GTPase RhoA regulates cytoskeleton dynamics during porcine oocyte maturation and early embryo development. *Cell Cycle*, **13**, 3390-3403. DOI: 10.4161/15384101.