

REVIUL LITERATURII



© Cornelia Lazăr, Olga Tagadiuc, Svetlana Protopop, Ana Mișina, Valeriana Pantea

Cornelia Lazăr¹, Olga Tagadiuc¹, Svetlana Protopop¹, Ana Mișina², Valeriana Pantea³

ASPECTE ALE METABOLISMULUI ÎN ȚESUTUL OVARIAN

¹ Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Catedra de biochimie și biochimie clinică,

² IMSP Institutul Mamei și Copilului, Secția de ginecologie chirurgicală

³ Laboratorul Biochimie, USMF „Nicolae Testemițanu”

SUMMARY

ASPECTS OF OVARIAN TISSUE METABOLISM.

Ovarian pathology is diverse and frequent, so this organ metabolism research has become a priority for the scientists of the last decades. Many studies have focused on elucidating the metabolic activity of oocytes and cells surrounding them. There is a dependence for converting substrates, obtaining energy, growth and development.

РЕЗЮМЕ

АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА ТКАНИ ЯИЧНИКОВ.

Патология яичников разнообразна и часто, поэтому исследование их метаболизма стало приоритетной задачей для учёных последних десятилетий. Многие исследования были сосредоточены на выяснении метаболическую активность ооцитов и клеток, окружающих их, и, таким образом, была обнаружена зависимость клеток для превращения субстратов, получение энергии, роста и развития.

Introducere. Studii *in vivo* și *in vitro* au relevat diferite căi metabolice ce au loc la nivelul ovarelor și diverse substraturi cu potențial energetic utilizate de ovocite, ceea ce reprezintă cheia potențialului înalt de

dezvoltare [1]. Metabolismul ovocitelor și foliculilor mamiferelor a fost studiat mai ales în foliculii antrali și în ovocitele mature. Despre metabolism cu referire la stadiile inițiale ale foliculogenezei sunt puține date.

Totuși, informațiile de care dispunem la moment ne indică faptul că profilul metabolic se modifică dinamic pe măsura dezvoltării foliculilor. Astfel, acizii grași ar putea susține dezvoltarea ovocitului [1, 2], iar metabolismul glucidelor și al aminoacizilor de la nivelul ovarelor indică faptul că o cooperare metabolică între ovocit și celulele de sprijin stă la baza metabolismului complex de la acest nivel [3].

Aspecte ale metabolismului lipidelor

Lipidele sunt molecule hidrofobe sau amfipatice cu diverse roluri biologice, fiind o sursă bogată de energie [1, 2], mediatori ai semnalizării celulare și baza membranelor plasmatice și a organitelor. Acizii grași intră în componența lipidelor membranare, reprezintă precursori pentru sinteza prostaglandinelor și au funcție de ancorare a proteinelor la membranele celulare. Acizii grași sunt, de asemenea, stocați intracelular ca triacilgliceroli în picături de lipide, fiind o sursă importantă de energie. La necesitate, trigliceridele sunt scindate de către lipazele prezente atât în ovocite, cât și în celulele cumulus, iar acizii grași rezultați în procesul de lipoliză sunt ulterior incluși în procesul de beta-oxidare. În complexele cumulus-ovocit (COCs), beta-oxidarea este indusă de hormonul luteinizant (LH) [2].

Acizii grași sunt de câteva ori mai bogați în energie decât glucoza. Generarea de ATP din lipide are loc în mitocondrii prin beta-oxidarea acizilor grași, etapa limitantă a procesului fiind catalizată de carnitin-palmitoil transferaza 1B (CPT1B) [1, 3], proces ce necesită carnitină. CPT1B atașează carnitina la acidul gras, ceea ce permite intrarea acestuia în matricea mitocondrială. Activitatea CPT1B este reglată la nivelul expresiei ARNm și prin inhibiție alosterică. În matricea mitocondrială carnitina este înlăturată

de carnitin-palmitoil transferaza 2 (CPT2), iar acidul gras intră în procesul de beta-oxidare, producând multiple molecule de acetyl-coenzima A (CoA). Oxidarea ulterioară a acetyl-CoA în ciclul acizilor tricarboxilici (TCA) generează o cantitate semnificativă de ATP (fig. 1). Astfel, carnitina este un cofactor important pentru dezvoltarea ovocitelor, iar acizii grași sunt o sursă esențială de energie pentru acestea [1]. În același timp, se menționează că efectul benefic al L-carnitinei poate fi datorat și acțiunii sale antiapoptotice și anti-oxidante (cu o creștere concomitentă intracelulară de glutatation în ovocite) [3].

Mai multe studii au demonstrat prezența incluziunilor de lipide citoplasmatică în mitocondrii, reticulul endoplasmatic pe parcursul maturizării ovocitelor. Asocierea mitocondriilor cu picături de lipide indică faptul că acizii grași servesc drept sursă energetică pentru oxidarea mitocondrială [4, 5]. Dovadă că lipidele sunt utilizate în procesul de maturizare a ovocitelor servesc studiile pe ovocite porcine [6, 7] și bovine [8, 9] în care s-a determinat că, pe parcursul maturării, scade conținutul de trigliceride de la nivelul acestora [6, 7, 8, 9]. Astfel, în figura 2 este arătat cum sunt mobilizați și catabolizați acizii grași în complexele cumulus-ovocit:

(1) Acizii grași liberi în lichidul folicular sunt legați de albumină [2, 10] și probabil pătrund în celule prin intermediul transportatorilor de acizi grași sau difuzează direct prin dublul strat de lipide [2].

(2) Mobilizarea triacilglicerolilor din lipoproteinele fluidului folicular poate avea loc prin acțiunea lipoproteinlipazei extracelulare ce eliberează acizii grași, care ulterior sunt disponibili pentru a fi preluați de celulă [2].

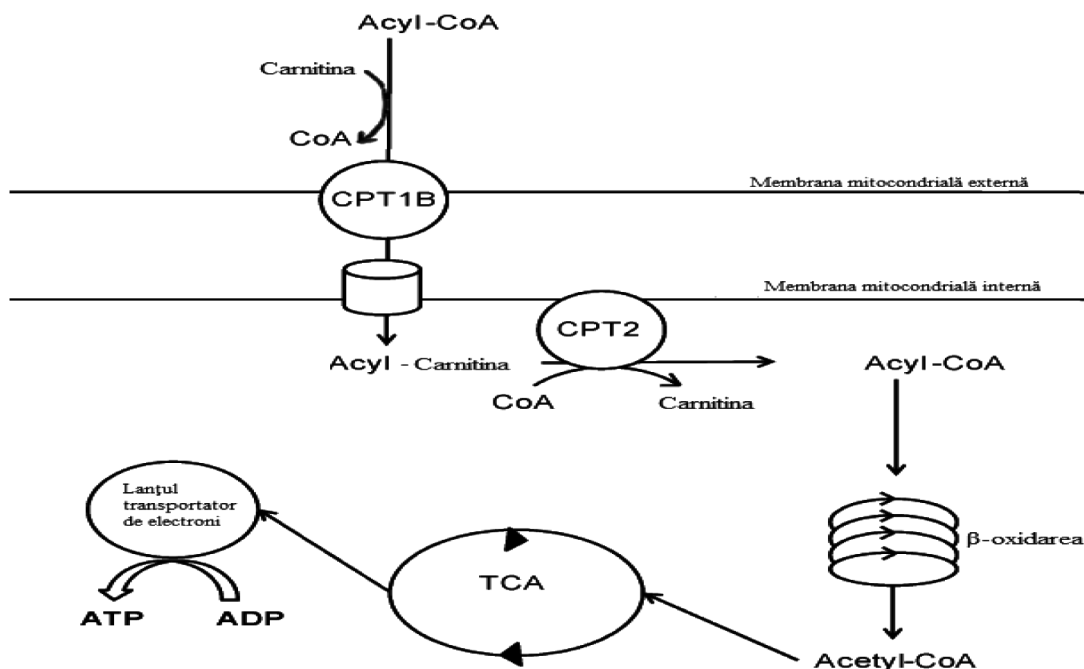


Fig.1. Reprezentarea schematică a procesului de beta-oxidare conform Dunning K.R. et al., 2010 [1].

(3) Triacilglicerolii intracelulari sunt stocați în picături de lipide, înconjurați de proteine, inclusiv proteina perilipin-2 în ovocite, care reglează dimensiunea picăturii de lipide și restricționează accesul lipazelor intracelulare spre miezul neutru sau susțin activitatea lipolitică în condiții metabolice sau hormonale adecvate [2, 11]. La activare, proteinele din picăturile de lipide facilitează hidroliza triacilglicerolilor mediată de lipază și eliberarea de acizi grași [2].

(4) Acizii grași intracelulari generați fie prin transport sau lipoliză sunt apoi disponibili pentru metabolism prin β -oxidare în mitocondrii [2].

Produsele transcripției genelor implicate în procesul de β -oxidare (acil-CoA sintetaze, acil-CoA dehidrogenaze și enoil-CoA hidratate) au fost detectate în ovocitele umane și celulele cumulus [12]. Generarea de ATP în ovocitele mamiferelor se bazează aproape exclusiv pe utilizarea acizilor grași și a piruvatului [13].

Tehnici PCR și hibridizarea *in situ* au arătat că 7 produse ale transcripției ce codifică enzime implicate în biosinteza colesterolului *Mvk*, *Pmvk*, *Fdps*, *Sqle*, *Cyp51*, *Sc4mol* și *Ebp* sunt intens exprimate în celulele cumulus, dar nu și în ovocite, sugerând faptul că în ovocitele șoarecilor lipsește sistemul enzimatic necesar pentru sinteza colesterolului. De asemenea, ovocitele sunt, probabil, incapabile de a prelua colesterol din mediul lor deoarece receptorii pentru HDL-colesterol și LDL-colesterol nu sunt exprimați de către ovocitele de șoarece [14, 15]. Astfel, celulele cumulus sunt surse de colesterol pentru ovocite [16].

Aspecte ale metabolismului carbohidraților

Glucosa este un metabolit important pentru COC și este metabolizată prin glicoliză, calea pentozofosfat (PPP), biosinteza de hexozamine (HBP) și calea poli-ol. Pe parcursul maturării ovocitului o mare parte din glucosa se metabolizează în celulele cumulus pe calea glicolitică pentru a furniza substraturi, cum ar fi piruvatul, pentru producerea de energie în ovocit (figura 3). Celulele cumulus oferă ovocitului nutrienți care facilitează maturarea, în special cea nucleară [17].

Ca rezultat al glicolizei se obține piruvat, care mai departe poate fi metabolizat prin TCA, urmat de fosforilarea oxidativă și producerea de ATP. Calea pentozofosfat produce NADPH pentru reducerea glutationului. Fosforibozil pirofosfatul (PRPP) este, de asemenea, produs în calea pentozofosfat și este un substrat pentru sinteza *de novo* a purinei, importantă pentru reglarea meiozei în ovocit. Produsele căii poli-ol includ fructoza și sorbitolul. Calea poli-ol este implicată în diferențierea țesutului ovarian și remodelare în timpul ciclului menstrual. Calea HBP este importantă prin producerea de substraturi pentru matricea extracelulară, pentru extinderea cumulus și O-glicozilare [17].

În timp ce ovocitele aflate în creștere utilizează preferențial piruvatul, compartimentul somatic al foli-culilor ovarieni este mult mai glicolitic [3, 17]. Astfel, piruvatul este principalul substrat energetic utilizat de către ovocitele în curs de maturizare, iar celulele folliculare pot suplini necesitățile energetice ale ovocitelor prin metabolismul altor substraturi [17, 18]. S-a

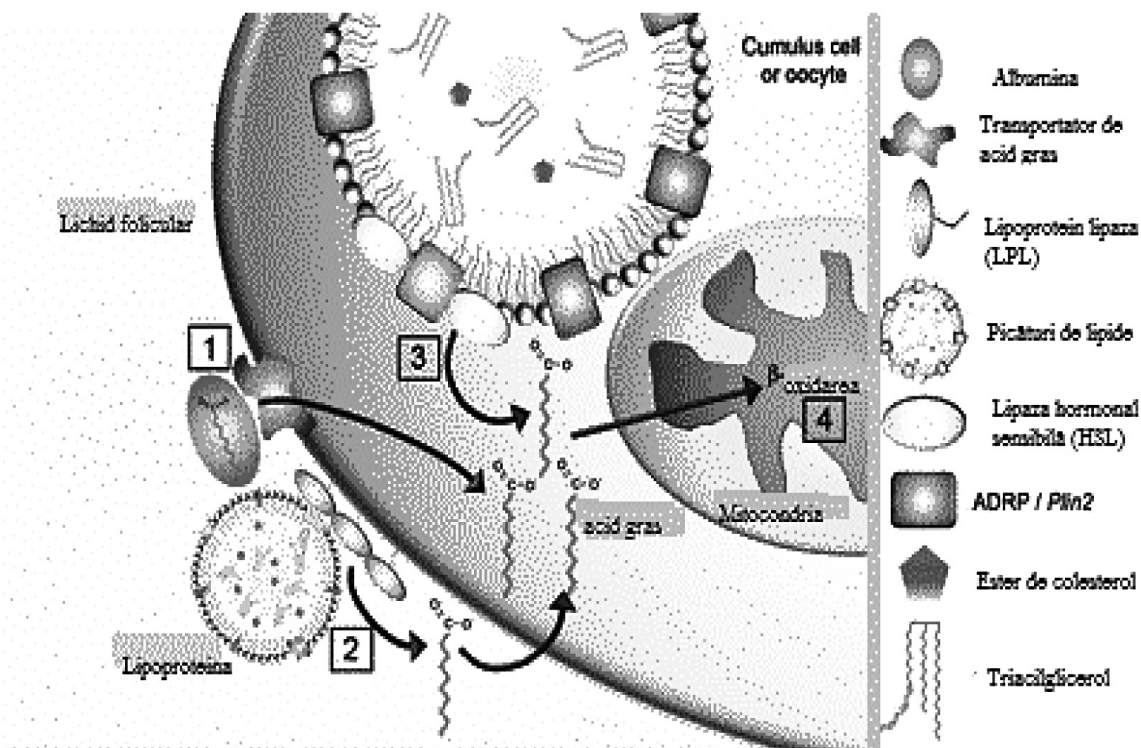


Fig.2. Schema mecanismului propus de mobilizare și catabolism al acizilor grași liberi din complexul cumulus-ovocit conform Dunning K.R., et al., 2014 [2].

arătat că și celulele germinale primordiale preferențial oxidează piruvatul față de glucoză [19], indicând existența procesului de oxidare aerobă în aceste celule. În stadiile inițiale de dezvoltare ale ovocitelor, studiinduse metabolismul energetic, s-a stabilit că glucoza și lactatul nu sunt utilizate atât de eficient precum piruvatul, nu a fost detectată oxidarea glucozei, dar a fost observată oxidarea piruvatului [20].

Necesitățile energetice ale ovocitelor în creștere par să fie reflectate de sporirea consumului de piruvat și oxigen [21], glucoza reprezentând un substrat energetic minor [22]. Acesta se modifică odată cu formarea foliculilor antrali, care sunt predominant glicolitici. Modificarea activității metabolice a ovocitului ar putea fi legată de disponibilitatea scăzută de oxigen, inițierea sintezei de estrogeni și creșterea necesităților energetice [23, 24].

Stadiul final al foliculogenezei *in vivo* este marcat de creșterea preovulatorie a gonadotropinelor. *In vitro*, gonadotropinele determină o asimilare crescută de glucoză de către foliculi [23, 25, 26].

Metabolismul glucozei este, de asemenea, influențat de către insulină și factorii de creștere ovarieni [17, 27]. Ovulul are o capacitate scăzută de absorbție a glucozei, în ciuda expresiei înalte a transportatorilor facilitatori de glucoză 1, 3 și 8 (SLC_{2A}₁, SLC_{2A}₃ și SLC_{2A}₈) în ovocite [17, 28]. Spre deosebire de acestea, celulele cumulus exprimă un transportator suplimentar de glucoză, 4 (SLC_{2A}₄) [17, 25, 29, 30], care are o afinitate înaltă pentru glucoză (Km~2-5 mM)

și este un transportator insulino-sensibil, astfel încât rata de transport a glucozei în celule prin intermediul SLC_{2A}₄ tinde să se bazeze mai mult pe insulină și pe nivelul de insulin-like growth factori decât pe concentrația de glucoză [17].

În afară de glicoliză se sugerează că glucoza este metabolizată și prin intermediul căii pentozofosfat [31]. Această idee este susținută de activitatea relativ înaltă a enzimei glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, comparativ cu activitatea enzimei glicolitice fosfofructokinaza (enzimă care este supusă reglării și limitează procesul de glicoliză), în ovocitele de bovine pe parcursul maturizării *in vitro* [32].

Enzimele necesare pentru metabolismul galactozei au fost detectate în țesutul ovarian. În mod normal reacțiile decurg în direcția formării UDP-galactozei și a glucozo-1-fosfatului. Ulterior, UDP-galactoza, sub acțiunea epimerazei, este convertită în UDP-glucoză. Atât UDP-glucoza, cât și UDP-galactoza sunt importante pentru sinteza de glicoproteine și glicolipide. O reacție accesorie importantă mediată de către UDP-glucozo-pirofosforilază duce la formarea UDP-glucozei din UTP și glucoză-1-fosfat. Dintre toate enzimele implicate în metabolismul galactozei, activitatea UDP-glucozo-pirofosforilazei este cea mai înaltă, sugerând ideea că producerea pe această cale a UDP-glucozei poate fi importantă în țesutul ovarian normal, probabil având un rol considerabil în suportul celulelor germinale, maturarea foliculilor și/sau steroidogeneza. S-a stabilit că concentrația de

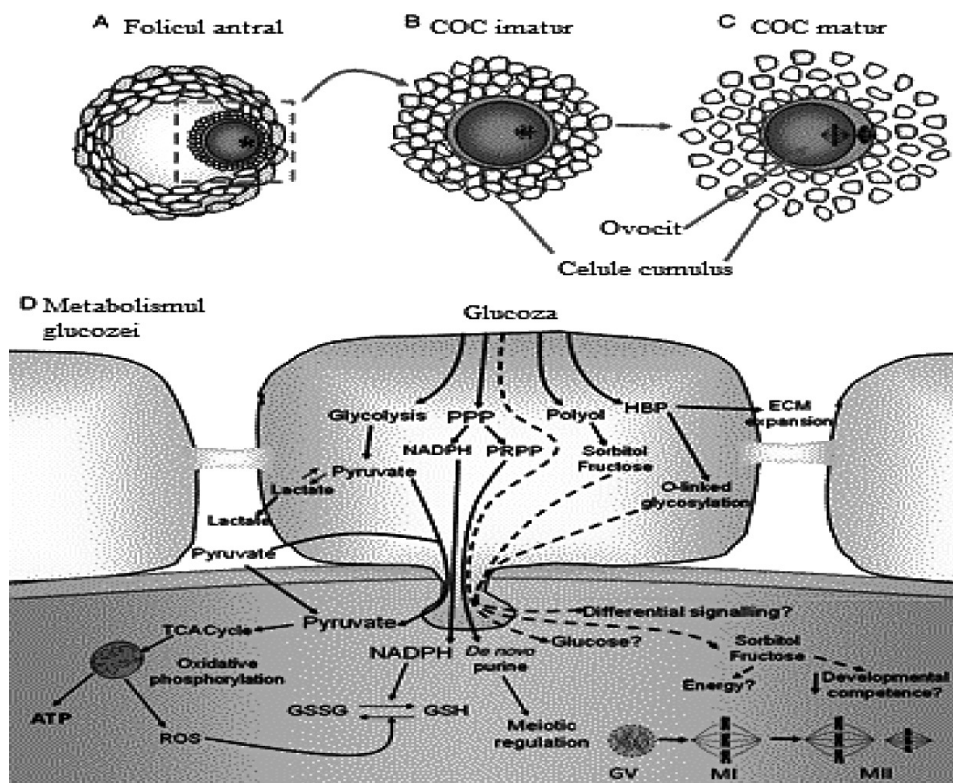


Fig.3. Metabolismul glucozei în foliculi conform Sutton-McDowall M.L. et al., 2010 [17].

UDP-glucoză și UDP-galactoză sunt mult mai mari în ovare, comparativ cu testiculele nongalactozemicilor, fapt ce indică o sinteză activă de glicoproteine, glicolipide și de alte macromoleculă ce conțin galactoză [33].

Aspecte ale metabolismului aminoacizilor

Metabolismul aminoacizilor în foliculi și ovocite este cercetat insuficient [34, 35]. Mai multe studii ce investighează aceste aspecte sunt axate prioritar pe observarea dezvoltării embrionilor [36, 37].

Ovocitele în creștere se caracterizează printr-o activitate înaltă a sintezei de ARN și proteine [38]. Celulele cumulus, de asemenea, prezintă o activitate crescută a enzimelor implicate în metabolismul aminoacizilor, cum ar fi aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), malat dehidrogenaza. Primul pas în catabolismul aminoacizilor constă în eliminarea azotului din poziția alfa prin reacția de transaminare, după care scheletul de carbon rezultat este degradat pentru a se obține energie. Deoarece reacțiile catalizate de transaminaze sunt reversibile, acestea pot fi implicate atât în catabolism, cât și în biosinteză [39]. La fel, reacțiile catalizate de ALT, AST și malat dehidrogenază produc substraturi pentru TCA, cum ar fi piruvat, oxaloacetat și malat [3, 39].

Aminoacizii sunt folosiți ca substraturi pentru sinteza proteinelor, nucleotidelor (glutamina, acidul asparagic, glicina), glutatiunii (acidul glutamic, cisteina, glicina), glicoproteinelor și a moleculelor de semnalizare, cum ar fi oxidul de azot (arginina). De asemenea, aminoacizii sunt folosiți ca substraturi energetice, ca reglatori ai pH-ului și osmolarității (glicina, alanina, glutamina etc.), chelatori ai metalelor grele (glicină), donatori de grupe metil (metionina) și în reacții anaplerotice (acidul aspartic, acidul glutamic, leucina, lizina, izoleucina etc.) [3].

Studii de măsurare a nivelului de aminoacizi în fluidul folicular și tractul reproductiv au furnizat informații valoroase despre substraturile disponibile. Ca exemplu, la nivelul tractului reproductiv, glutamina, glicina și alanina sunt în mod constant printre aminoacizii cu cele mai mari concentrații [40].

Cercetările orientate spre depistarea celor mai exprimate gene din celulele cumulus față de alte celule din foliculi au evidențiat Slc38a3. Este un transportator de aminoacizi cuplat cu sodiul, având preferință pentru L-glutamat, L-histidină și L-alanină. Expresia Slc38a3 ARNm a fost stimulată de către ovocite prin intermediul factorilor paracrini [41]. Ovocitele mature sunt dependente de celulele cumulus în sensul captării aminoacizilor, pentru realizarea acestui scop fiind importante joncțiunile gap și factorii paracrini [41, 42]. Joncțiunile gap joacă un rol crucial în comunicarea bidirecțională dintre ovocite și celulele cumulus, permițând trecerea diferitor tipuri de molecule (spre exemplu, aminoacizi, piruvat) [16, 42]. Într-adevăr,

s-a arătat că expresia proteinelor Cx43 și Cx37 ale joncțiunilor gap în celulele granuloase și ovocite este foarte importantă în dezvoltarea ovocitelor și foliculilor [43, 44].

Studii funcționale anterioare, folosind captarea traserului radioactiv, au indicat prezența a 18 sisteme de transport pentru aminoacizi în ovocitele șoarecilor și embrioni [34, 35, 37], care vorbește despre capacitatea ovocitelor și a embrionilor de a utiliza aminoacizi din mediul extern [35]. Cercetări efectuate pe bovine au indicat că LH crește metabolismul oxidativ al glutaminei în ovocite și COCs [45], iar adaosul de glutamină în mediul de creștere pare să stimuleze maturarea nucleară a ovocitelor [46]. Într-adevăr, o parte din necesarul de ATP ar putea fi suplinit prin metabolizarea oxidativă a glutaminei și a glicinei cu includerea TCA [22, 45].

Concluzii

Metabolismul energetic în țesutul ovarian presupune o cooperare între celule, asigurându-se astfel buna funcționare a acestora. Totuși, sunt necesare cercetări ulterioare pentru evidențierea tuturor factorilor implicați în activitățile metabolice de la acest nivel.

Abrevieri

ALT – alanin aminotransferaza
ARN – acid ribonucleic
ARNm – acid ribonucleic mesager
AST – aspartat aminotransferaza
ATP – adenozin trifosfat
CoA – acetil-coenzima A
COCs – complexe cumulus-ovocit
CPT1B – carnitin-palmitoil transferaza 1B
CPT2 – carnitin-palmitoil transferaza 2
GSH – glutation redus
GSSG – glutation oxidat
HBP – biosinteză de hexozamine
HDL – lipoproteine cu densitate mare
LDL – lipoproteine cu densitate mică
LH – hormon luteinizant
MI – metafaza I
MII – metafaza II
MDH – malat dehidrogenază
NADPH – nicotinamid adenin dinucleotid fosfat
PPP – calea pentozofosfat
PRPP – fosforibozil pirofosfat
ROS – specii reactive de oxigen
TCA – ciclul acizilor tricarboxilici
UTP – uridin trifosfat
UDP – uridin difosfat

Referințe bibliografice

1. Dunning K. R., Cashman K., Russell D.L., Thompson J.G., Norman R.J., Robker R.L. Beta-Oxidation is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. *Biology of reproduction* 2010; 83: 909–918.

2. **Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L.** Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* 2014; 148: R15–R27.
3. **Collado-Fernandez E., Picton H.M., Dumollard R.** Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int. J. Dev. Biol.* 2012; 56: 799–808.
4. **Nagano M., Katagiri S., Takahashi Y.** Atp content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 2006; 14: 299–304.
5. **Sturmeijer R.G., O'toole P.J., Leese H.J.** Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: Lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 2006; 132: 829–837.
6. **Alvarez G.M., Dalvit G.C., Cetica P.D.** Influence of the cumulus and gonadotropins on the metabolic profile of porcine cumulus–oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Reproduction in Domestic Animals* 2012; 47: 856–864.
7. **Sturmeijer R.G., Leese H.J.** Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 2003; 126: 197–204.
8. **Ferguson E.M., Leese H.J.** Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* 1999; 116: 373–378.
9. **Kim J.Y., Kinoshita M., Ohnishi M., Fukui Y.** Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction* 2001; 122: 131–138.
10. **Valecx S., Arias-Alvarez M., De Pauw I., Fievez V., Vlaeminck B., Franssen E., Bols P., Leroy J.** Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014; 12:13.
11. **Yang X., Dunning K.R., Wu L.L., Hickey T.E., Norman R.J., Russell D.L., Liang X., Robker R.L.** Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reproduction, Fertility and Development* 2010; 22: 1262–1271.
12. **Montjean D.,Entezami F., Lichtblau I., Belloc S., Gurgan T.,Menezo Y.** Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in β oxidation in oocytes and cumulus cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2012; 29: 1221–1225.
13. **Bradley J., Pope I., Masia F., Sanusi R., Langbein W., Swann K., Borri P.** Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy. *Development* 2016 143: 2238–2247.
14. **Sato N., Kawamura K., Fukuda J., Honda Y., Sato T., Tanikawa H., Kodama H., Tanaka T.** Expression of LDL receptor and uptake of LDL in mouse preimplantation embryos. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202(1–2): 191–194.
15. **Trigatti B., Rayburn H., Vinals M., Braun A., Miettinen H., Penman M., Hertz M., Schrenzel M., Amigo L., Rigotti A., Krieger M.** Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(16): 9322–9327.
16. **Su Y.-Q., Sugiura K., Eppig J.** Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism, *Semin. Reprod. Med.* 2009; 27(1): 32–42.
17. **Sutton-McDowall M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G.** The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 2010; 139: 685–695.
18. **Biggers J. D., Whittingham D. G., Donahue R. P.** The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967; 58(2): 560–567.
19. **Brinster R.L., Harstad H.** Energy metabolism in primordial germ cells of the mouse. *Exp Cell Res.* 1977; 109 (1): 111–117.
20. **Eppig J.J.** Analysis of mouse oogenesis *in vitro*. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. *J Exp Zool* 1976; 198: 375–382.
21. **Harris, S.E., Leese, H.J., Gosden, R.G., Picton, H.M.** Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. *Molecular Reprod Dev* 2009; 76: 231–238.
22. **Rieger D., Loskutoff N.M.** Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 257–262.
23. **Harris, S.E., Adriaens, I., Leese, H.J., Gosden, R.G., Picton, H.M.** Carbohydrate metabolism by murine ovarian follicles and oocytes grown *in vitro*. *Reproduction* 2007; 134: 415–424.
24. **Boland N.I., Humpherson P.G., Leese H.J., Gosden R.G.** The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis *in vitro*. *Hum Reprod* 1994; 9: 617–623.
25. **Roberts R., Stark J., Iatropoulou A., Becker D.L., Franks S., Hardy K.** Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: Response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation. *Biol Reprod* 2004; 71: 199–209.
26. **Sutton-McDowall M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G.** Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation: The influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 2004; 128: 313–319.
27. **Roy S.K., Terada D.M.** Activities of glucose metabolic enzymes in human preantral follicles: *In vitro* modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, epidermal growth factor, insulin-like growth factor i, and transforming growth factor b1. *Biol Reprod* 1999; 60: 763–768.

- 28. Augustin R., Pocar P., Navarrete-Santos A., Wrenzycki C., Gandolfi F., Niemann H., Fischer B.** Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2001; 60: 370–376.
- 29. Williams S.A., Blache D., Martin G.B., Foot R., Blackberry M.A., Scaramuzzi R.J.** Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 2001; 122: 947–956.
- 30. Nishimoto H., Matsutani R., Yamamoto S., Takahashi T., Hayashi K.G., Miyamoto A., Hamano S., Tetsuka M.** Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *Journal of Endocrinology* 2006; 188: 111–119.
- 31. Downs S.M., Humpherson P.G., Leese H.J.** Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol Reprod* 1998; 58: 1084–1094.
- 32. Cetica P., Pintos L., Dalvit G., Beconi M.** Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction* 2002; 124: 675–681.
- 33. Xu Y.K., Ng W.G., Kaufman F.R., Lobo R.A., Donnell G.N.** Galactose Metabolism in Human Ovarian Tissue. *Pediatric Research* 1989; 25(2):151-155.
- 34. Pelland A., Corbett H.E., Baltz J.M.** Amino acid transport mechanisms in mouse oocytes during growth and meiotic maturation. *Biol. Reprod.* 2009; 81: 1041-1054.
- 35. Hemmings K.E., Leese H.J., Picton H.M.** Amino acid turnover by bovine oocytes provides an index of oocyte developmental competence *in vitro*. *Biol Reprod* 2012; 86: 165, 161-112.
- 36. Sturmey R.G., Brison D.R., Leese H.J.** Symposium: Innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 486-496.
- 37. Van Winkle L.J.** Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol Reprod* 2001; 64: 1-12.
- 38. Picton H., Briggs D., Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 27-37.
- 39. Cetica P., Pintos L., Dalvit G., Beconi M.** Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction* 2003; 126: 753-763.
- 40. Hugentobler S.A., Diskin M.G., Leese H.J., Humpherson P.G., Watson T., Sreenan J.M., Morris D.G.** Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 445-454.
- 41. Eppig J.J., Pendola F.L., Wigglesworth K., Pendola J.K.** Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol Reprod* 2005; 73: 351- 357.
- 42. Sánchez F., Smitz J.** Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1896–1912.
- 43. Gittens J.E., Kidder G.M.** Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reagggregated mouse ovaries. *J. Cell Sci.* 2005; 118: 5071–5078.
- 44. Gittens J.E., Barr K.J., Vanderhyden B.C., Kidder G.M.** Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J. Cell Sci.* 2005; 118: 113–122.
- 45. Zuelke K.A., Brackett B.G.** Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1993; 48: 815-820.
- 46. Bilodeau-Goeseels S.** Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology* 2006; 66: 297-306.