

CLAUDIA BARBOSA FERNANDES

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS EQÜINOS:
COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS TCM 199, SOFaa E HTF:BME,
E AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE FSH BOVINO, FSH EQÜINO E DO
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO EQÜINO POR MEIO DA
TRANSFERÊNCIA DE OVÓCITOS**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista–UNESP,
Campus de Botucatu, como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Medicina Veterinária,
Área de Reprodução Animal.**

BOTUCATU – SP

2004

CLAUDIA BARBOSA FERNANDES

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS EQÜINOS: COMPARAÇÃO ENTRE OS
MEIOS TCM 199, SOFaa E HTF:BME, E AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE FSH
BOVINO, FSH EQÜINO E DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO EQÜINO POR
MEIO DA TRANSFERÊNCIA DE OVÓCITOS**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista
– UNESP, Campus de Botucatu, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.**

**Orientadora: Prof.^a Adj. Fernanda da Cruz Landim e
Alvarenga**

Co-orientador: Prof. Adj. Marco Antônio Alvarenga

BOTUCATU – SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Fernandes, Claudia Barbosa

Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre os meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do Hormônio de Crescimento Eqüino por meio da Transferência de Ovócitos / Claudia Barbosa Fernandes. – 2004.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2004.

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga.

Co-orientador: Marco Antonio Alvarenga.

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Eqüino – Reprodução.

CDD 636.0824

Palavras chave: Eqüinos; Maturação in vitro; Meios de cultivo; Ovócitos; Tranferência de ovócitos.

***Dedico este trabalho de dissertação aos meus pais,
Wania e Claudio, pelo exemplo de humildade, amor,
educação e incentivo que me permitiram a realização
de mais um ideal e ao meu noivo Alexandre pelo
carinho, paciência e colaboração constantes.***

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo;

A minha orientadora e amiga, **Prof^a. Adj. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**, pelos muitos ensinamentos, extrema paciência e pela grande colaboração teórica e prática, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho;

Ao meu co-orientador, **Prof. Adj. Marco Antonio Alvarenga**, pela amizade, pelos inúmeros esclarecimentos, e também pela grande ajuda prática na Transferência de Ovócitos, que foram imprescindíveis para o término desta dissertação;

Aos amigos e companheiros de trabalho **Elen, Karen Peres, Carla, Patrícia, Letícia, Gustavo, Karen Leão, Milena, Marcel, Lilian, Cely e Márcio** que prestaram uma grande ajuda durante toda a realização deste experimento que não tinha hora para acontecer;

As residentes **Karina, Camila, Carla e Lindsay** por serem sempre tão prestativas;

Aos professores **Papa, Nereu, Denise, Sony, João, Meira e Eunice** pelo apoio e interesse que tornaram tão agradável a convivência no departamento durante estes dois anos;

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal **Cristina, Márcio, Valter, Tico, Miguel, Edilson, Marquinho** e **D. Cida**, ao funcionário do Departamento de Zootecnia **Dito** e aos funcionários do Setor de **Transporte** da FMVZ-UNESP Botucatu, que sempre estiveram dispostos a ajudar quando eu mais precisei;

Aos professores **Cao** e **Nicoletti** do Departamento de Cirurgia Veterinária-FMVZ, UNESP, Botucatu, que gentilmente cederam animais para que fizéssemos as Transferências de Ovócitos;

A amiga e ex-professora **Maria Isabel Martins**, pelo interesse e companheirismo constantes;

*Aos funcionários do SIF (Frigorífico Rei do Gado – Santa Fé/PR), **Dr. Homero, Osni, Milton, Rafaél, Marcos Antônio, Murilo, Luiz Fabio, João Matias, Danilo, João Marcelo, Tiago Pereira e Tiago Lima** pela colaboração na colheita dos ovários;*

*Ao amigo e médico veterinário **Francisco Cordeiro Júnior** que possibilitou o contato inicial com o frigorífico e assim proporcionou que o material necessário à realização do trabalho fosse obtido;*

*Ao médico veterinário **Paulo Vinicius Mortensen Steagall** que com muito critério e competência foi o responsável pelas anestésias dos animais do experimento;*

*Ao **Centro de Microscopia Eletrônica – IB –UNESP, Botucatu**, que processou todo material que foi analisado em Microscopia Eletrônica de Transmissão;*

*A **Prof^a. Lidia Raquel de Carvalho**, que gentilmente elaborou a análise estatística;*

*As bibliotecárias, **Luciana e Rose**, que auxiliaram com as normas de dissertação e com a ficha catalográfica;*

*Ao **Frigorífico Rei do Gado – Santa Fé/PR**, por ter aberto suas portas para que fosse possível a colheita dos ovários durante a realização do experimento;*

*À **FAPESP**, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho (Processo. 01/12061-7);*

*A meu padrinho **Hélio** e minha tia **Maria**, que mesmo distantes sempre me estimularam e ajudaram;*

A todas as pessoas que, apesar de não mencionadas, contribuíram com este trabalho.

MUITO OBRIGADA!

***“Siga confiante na direção dos seus sonhos,
Viva a vida que imaginar”***

Henry Thoreau (1817-1862)

(cedido pela amiga Letícia)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS.....	24
REVISÃO DA LITERATURA.....	25
MATURAÇÃO OVOCITÁRIA.....	25
FATORES QUE INFLUENCIAM A MATURAÇÃO OVOCITÁRIA.....	30
MATURAÇÃO DO OVÓCITO EQUINO.....	36
MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO OVÓCITO EQUINO.....	42
TRANSFERÊNCIA DE OVÓCITOS.....	46
MATERIAL E MÉTODO.....	50
OBTENÇÃO DOS OVÁRIOS, COLHEITA E SELEÇÃO DOS OVÓCITOS.....	50

EXPERIMENTO I.....	54
Grupos Experimentais.....	54
Avaliação da Maturação Nuclear.....	55
Avaliação da Maturação Citoplasmática.....	55
Análise Estatística.....	57
 EXPERIMENTO II.....	 57
Grupos Experimentais.....	57
Avaliação da Maturação Nuclear.....	58
Avaliação da Maturação Citoplasmática.....	58
Tratamento Hormonal das Receptoras.....	58
Transferência dos Ovócitos.....	59
Diagnóstico de Gestação.....	61
Análise Estatística.....	61
 RESULTADOS.....	 62
 EXPERIMENTO I.....	 63
EXPERIMENTO II.....	72
TRANSFERÊNCIA DE OVÓCITOS.....	80
ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL.....	82
 DISCUSSÃO.....	 100
 CONCLUSÕES.....	 124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

A I: Anáfase I

AMPc*: Adenosina monofosfato cíclico

BME: “Basal medium eagle”

BSA*: Albumina sérica bovina

CCO: Complexo *cumulus* ovócito

CIV: cultivo *in vitro*

CO₂: Gás carbônico

CP: Corpúsculo polar

CSF: “Citostatic factors”

DNA*: Ácido desoxirribonucleico

E₂: Estradiol

eCG*: Gonadotrofina coriônica eqüina

ECP*: Cipionato de estradiol

EGF*: Fator de crescimento epidermal

eGH*: Hormônio de crescimento eqüino

EPE: Extrato de pituitária eqüina

ERK: “Extracelular regulation kinase”

FIV: Fertilização *in vitro*

FSH*: Hormônio folículo estimulante

FSHb*: Hormônio folículo estimulante bovino

FSHe*: Hormônio folículo estimulante eqüino

FSHs*: Hormônio folículo estimulante suíno

GC: Grânulos corticais

GH*: Hormônio de crescimento

GIFT*: Transferência intrafalopiana de gametas

GnRH*: Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG*: Gonadotrofina coriônica humana

HE: Hormônios esteróides

HTF: “Human tubal fluid”

ICSI*: Injeção intracitoplasmática de gametas

IGF-I* e II*: Fator de crescimento semelhante a Insulina I e II

LH*: Hormônio luteinizante

LHb*: Hormônio luteinizante bovino
LHe*: Hormônio luteinizante eqüino
LHs*: Hormônio luteinizante suíno
M I: Metáfase I
M II: Metáfase II
MAPK: “Mitogen activated protein kinase”
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
MIV: Maturação *in vitro*
Mos*: Quinase c-mos protooncogênese
MPF*: Fator promotor de maturação
O₂: Oxigênio
PBS: “Phosphate buffer saline”
pGH*: Hormônio de crescimento suíno
PIV: Produção *in vitro*
QVG: Quebra da vesícula germinativa
REL: Retículo endoplasmático liso
RNA*: Ácido ribonucleico
RNA^m*: Ácido ribonucleico mensageiro
RNA^r*: Ácido ribonucleico ribossômico
SFB: soro fetal bovino
SE: soro de égua no 1º dia de estro
SEO: soro de égua no dia da ovulação
SOFaa: “Sintetic ovidutal fluid” acrescido de aminoácidos
SPTZ: Espermatozóides
T I: Telófase I
TCM 199: “Tissue culture media 199”
TGF α e β : “Transforming growth factor α e β ”
TO: Transferência de ovócitos
TVA*: Aspiração folicular transvaginal
VG: Vesícula germinativa
ZP: Zona pelúcida

**Algumas abreviaturas foram mantidas como na língua inglesa pela consagração do uso.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Números de ovócitos obtidos de ovários de abatedouro no experimento I: recuperados, descartados, colocados para MIV, separados para a avaliação em MET, perdidos durante a manipulação e avaliados em microscopia de fluorescência, nos cinco procedimentos experimentais, no período de Agosto a Dezembro de 2002	62
Tabela 2- Números de ovócitos obtidos de ovários de abatedouro no experimento II: recuperados, descartados, colocados para MIV, separados para a avaliação em MET, transferidos, perdidos durante a transferência, perdidos durante a manipulação e que foram avaliados em microscopia de fluorescência, nos cinco procedimentos experimentais, no período de Junho a Outubro de 2003.....	63
Tabela 3– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II para ovócitos maturados <i>in vitro</i> no experimento I.....	64
Tabela 4– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i> em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002.....	64
Tabela 5– Análise de variância referente à porcentagem de degenerados para ovócitos maturados <i>in vitro</i> no experimento I.....	66
Tabela 6– Média e desvio padrão referente à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i> em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002.....	66
Tabela 7– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II viáveis para ovócitos maturados <i>in vitro</i> no experimento I.....	68

Tabela 8– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002.....**68**

Tabela 9– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II para ovócitos maturados *in vitro* no experimento I.....**70**

Tabela 10– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002.....**70**

Tabela 11– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II.....**72**

Tabela 12– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003.....**72**

Tabela 13– Análise de variância referente à porcentagem de degenerados para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II.....**74**

Tabela 14– Média e desvio padrão referente à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003.....**74**

Tabela 15– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II viáveis para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II.....**76**

Tabela 16– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003.....**76**

Tabela 17– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II viáveis para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II.....**78**

Tabela 18– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003.....**78**

Tabela 19- Transferências de Ovócitos realizadas durante o mês de Outubro de 2003, com relação ao número de ovócitos transferidos, grupo experimental, diagnóstico de gestação (DG) aos 15º e 90º dias e porcentagem de vesículas embrionárias.....**80**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Colheita (a, b, c), manipulação (d, e, f) e transporte (g, h) dos ovários eqüinos provenientes de abatedouro.....	51
Figura 2- Técnica de fatiamento dos ovários provenientes de abatedouro para a colheita de ovócitos eqüinos.....	52
Figura 3- Aspecto dos ovócitos imaturos de eqüino selecionados para a maturação <i>in vitro</i>	53
Figura 4 A e B- Aspecto da cromatina na placa metafásica II e do corpúsculo polar em microscopia de fluorescência de ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i>	56
Figura 5- Técnica de Transferência cirúrgica de ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i> ao oviduto de éguas receptoras.....	60
Figura 6– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i> em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 ($p=0,095$).....	65
Figura 7– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i> em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 ($p=0,351$).....	67
Figura 8– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i> em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 ($p=0,134$).....	69
Figura 9– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase I + metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados <i>in vitro</i> em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 ($p=0,369$).....	71

Figura 10– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003 (p=0,545).....73

Figura 11– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003 (p=0,448).....75

Figura 12– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003 (p=0,390).....77

Figura 13– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase I + metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003 (p=0,518).....79

Figura 14- Aspecto ultra-sonográfico das vesículas embrionárias com 15, 20 e 28 dias, resultantes da Transferência de Ovócitos eqüinos maturados *in vitro*, em meio HTF:BME suplementado com FSH bov e FSH eq + eGH.....81

Figura 15- Aspecto geral do citoplasma de um ovócito eqüino imaturo, com a presença de grande quantidade de mitocôndrias (m) associadas a grânulos lipídicos (l); podem ser observados prolongamentos celulares (seta) das células do *cumulus* através da zona pelúcida (zp).....83

Figura 16- Aspecto das gotas lipídicas(l) em processo de metabolização, associada com mitocôndrias(m) e contendo restos membranosos (seta) em ovócito eqüino imaturo.....84

Figura 17- Aspecto de mitocôndrias com formas irregulares (seta); complexo de Golgi (G) na periferia do ovoplasma associado a vesículas recobertas (ver), semelhantes as originadas por pinocitose (ve) na superfície do oolema; grânulos corticais (gc) associados a mitocôndrias (m); retículo endoplasmático liso (rel) na região subcortical associado a mitocôndrias; e microvilosidades (mv) atravessando o espaço perivitelínico (ep), caracterizando o ovócito eqüino imaturo.....**85**

Figura 18- Grânulos corticais(gc) na proximidade de complexo de Golgi (G), em ovócito eqüino imaturo.....**86**

Figura 19 A e B- Na figura A o espaço perivitelínico (ep) encontra-se atravessado por microvilosidades (mv), em ambas as figuras os complexos juncionais (j) aparecem entre o ovoplasma e os prolongamentos citoplasmáticos das células do *cumulus*, caracterizando o ovócito eqüino imaturo.....**87**

Figura 20- Aspecto do núcleo (nu) periférico, esférico de ovócitos eqüinos imaturos, com nucléolo (nl) fibrilar e poros (seta) na membrana nuclear.....**88**

Figura 21A e B- Aspecto dos ovócitos maturados *in vitro* no experimento I, os ovócitos apresentaram o espaço perivitelínico (ep) preenchido por microvilosidades (seta), e a presença de mitocôndrias (m) associadas a gotas lipídicas (l) representadas na figura A.....**90**

Figura 22- Aspecto das mitocôndrias (m) associadas ao retículo endoplasmático liso (rel) em ovócitos maturados no experimento I.....**91**

Figura 23- Aspecto dos grânulos corticais (setas) localizados tanto na região central como na periferia do ovoplasma para ovócitos maturados no experimento I.....**92**

Figura 24- Aspecto do espaço perivitelínico (ep) preenchido por grandes restos celulares (seta) para ovócitos maturados no experimento I.....**93**

Figura 25- Junções (seta) entre as células do <i>cumulus</i> e os prolongamentos citoplasmáticos de ovócitos maturados em meio TCM199 e SOFaa.....	94
Figura 26- Aspecto do ovócito maturado em meio HTF:BME, apresentando menor quantidade de restos celulares no espaço perivitelínico (ep) e uma distribuição mais uniforme dos grânulos corticais (seta).....	95
Figura 27- Aspecto dos ovócitos maturados no experimento II, apresentando grande quantidade de grânulos lipídicos (l). Com a presença de mitocôndrias (m) com formato arredondado distribuídas em todo citoplasma e de grânulos corticais (seta) alinhados junto ao oolema.....	97
Figura 28- Aspecto da distribuição homogênea das mitocôndrias (m) em formato arredondado, do espaço perivitelínico (ep) estreito com a presença de microvilosidades (mv) e dos grânulos corticais alinhados junto ao oolema para os ovócitos eqüinos maturados em meio HTF:BME suplementado com FSH eq.....	98
Figura 29- Presença de menor número de grânulos corticais (gc) na periferia do ovócito eqüino maturado em meio HTF:BME suplementado com FSHbov.....	99

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a maturação nuclear e citoplasmática em duas condições experimentais. No experimento I (Exp I) comparou-se a utilização de três diferentes meios de cultivo TCM-199, SOFaa e HTF:BME na maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos. No experimento II (Exp II) avaliou-se a habilidade dos ovócitos eqüinos maturados em meio HTF:BME suplementado com FSH homólogo e heterólogo e hormônio de crescimento eqüino (eGH), de serem fertilizados e passar pelo desenvolvimento embrionário e fetal após a transferência de ovócitos. Os ovários eqüinos foram obtidos de abatedouro e os ovócitos recuperados pela técnica de fatiamento. Em cada experimento foram realizadas cinco procedimentos com uma média de 30 ovócitos por grupo, estes foram maturados por 36 a 40 horas à 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A avaliação da maturação nuclear nos dois experimentos foi realizada em ovócitos desnudados, transferidos para gotas colocadas sobre lâmina histológica contendo 10µl Hoechst 33342 e examinados em microscópio invertido com luz fluorescente. A avaliação da morfologia citoplasmática foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Transmissão. A análise estatística foi realizada através de ANOVA Para a transferência de ovócitos foram utilizadas receptoras não cíclicas, tratadas com Cipionato de Estradiol (ECP) por três dias (5, 3 e 2ml/dia IM). As receptoras foram inseminadas 12 horas pré e pós cirurgia, com 2×10^9 espermatozóides viáveis por inseminação. Foi realizada a transferência de 12,8 ovócitos maturados em média, nas condições do Exp II para cada égua, que após a cirurgia recebeu 200 mg/dia de progesterona (Laboratório BET) até o diagnóstico de gestação ultra-sonográfico, realizado nos dias 15 e 90 após a transferência. Os resultados obtidos no Exp I demonstraram que não houve diferença estatística ($p=0,095$) entre os meios de maturação testados. A maturação nuclear foi de 29,2%, 23,8% e 13,8% para os grupos HTF:BME, SOFaa e TCM199, respectivamente. Estes índices menores que os observados na literatura. No entanto, neste trabalho não foi utilizada a adição de soro ao meio de cultivo. Da mesma forma a porcentagem de ovócitos degenerados não diferiu entre os grupos experimentais (32,6,%, 32,8% e 43,4% para HTF:BME, SOFaa e TCM199 respectivamente, $p=0,351$). O alto número de ovócitos degenerados obtidos foi relacionado ao alto intervalo entre o abate e o início da maturação ovocitária (> 10

horas). Na avaliação da morfologia citoplasmática, os ovócitos cultivados em meio TCM199 e SOFaa apresentaram sinais de incompleta maturação citoplasmática e exibiram características de reação cortical prematura, enquanto os ovócitos maturados em meio HTF:BME apresentavam aparente melhora nas características citoplasmáticas. No Exp II, esperava-se resultados positivos com a adição de gonadotrofina (FSHe) e hormônio de crescimento eqüino (eGH) no meio de cultivo HTF:BME. No entanto, os resultados obtidos demonstraram não haver diferenças estatísticas ($p= 0,545$) significativas entre os grupos estudados. As taxas de maturação nuclear foram de 37,1%; 25,8% e 29,8% para os grupos com FSHbov, FSHeq e FSHeq+eGH, respectivamente. A porcentagem de ovócitos degenerados não diferiu entre os grupos experimentais (36,5%; 35,0% e 21,3% para FSHbov, FSHeq e FSHeq+eGH respectivamente). Na análise da morfologia citoplasmática do Exp II, observou-se que somente a adição de FSHeq no meio HTF:BME, resultou em uma melhora significativa da morfologia citoplasmática, representada por sinais de maturação semelhantes aos encontrados em ovócitos maturados *in vivo*. Após a transferência de ovócitos, uma égua do grupo FSHbov e outra do grupo FSHeq+eGH ficaram prenhes, com a presença de uma vesícula embrionária em cada, representando taxas de 10 e 6,8% de gestação, respectivamente. Os resultados demonstram que a porcentagem ovócitos eqüinos competentes após a maturação *in vitro* ainda é baixa.

Palavras Chave: eqüino, maturação, meio de cultivo, ovócito e transferência de ovócitos

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the nuclear and cytoplasmatic oocyte maturation in two situations. Experiment I (ExpI) aimed to compare the use of TCM-199, SOFaa and HTF:BME media to mature equine oocytes in vitro. Experiment II (ExpII) evaluate the ability of equine oocytes matured in HTF:BME media containing homologous and heterologous FSH, associated with equine growth hormone (eGH), to undergo maturation and development after oocyte transfer. Equine ovaries were obtained in a slaughterhouse and the oocytes recovered after slicing the ovaries. For each experiment, five replicates were performed. After selection an average of 30 oocytes per group were matured during 36 to 40 hours at 38.5°C In an atmosphere with 5% CO₂ in air. Nuclear maturation in both experiments was evaluated staining the oocytes with 10µl Hoechst 33342. Cytoplasmatic maturation was analyzed in five oocytes per group using Transmission Electron Microscopy. All data was analyzed using ANOVA. For oocyte transfer, non-cycling recipient mares were treated with Estradiol Cipionate (ECP) during 3 days (5, 3 and 2ml/day IM). After transfer of an average of 12,8 oocytes matured in the Exp II conditions, each recipient mare was inseminated 12 hours pre- and post ovulation with 2×10^9 live sperm cells. After the surgery all recipient mares received 200 mg/day of progesterone (BET Laboratory, Rio de Janeiro, Brazil) until pregnancy detection, by ultra sound examination at days 15 and 90 after transfer. The results obtained in Exp I showed no statistic differences ($p=0,095$) when maturation media were tested. Nuclear maturation was 29,2%, 23,8% and 13,8% for groups HTF:BME, SOFaa and TCM199 respectively. These results are lower than many observed in the literature, however, in this experiment no serum was added to the maturation media. The percentage of degenerated oocytes did not differ among experimental groups (32,6,%, 32,8% and 43,4% for HTF:BME, SOFaa and TCM199 respectively, $p=0,351$). The high number of degenerated oocytes obtained seems to be due to the long time between slaughter and the beginning of maturation (> 10 hours) and the use of BSA in culture. When the analysis of cytoplasmatic morphology was performed, the oocytes cultured in TCM199 and SOFaa showed signs of incomplete cytoplasmatic maturation and characteristics of premature cortical reaction, while the oocytes cultured in HTF:BME media had better cytoplasmatic characteristics. In Exp. II, positive results were

expected with the use of homologous FSH and GH to mature equine oocytes. However the results obtained showed no statistic differences ($p= 0,545$) when bovine or equine FSH was used, or when eGH was added. Nuclear maturation was 37,1%; 25,8% and 29,8% for groups with FSHbov, FSHeq and FSHeq+eGH respectively. The percentage of degenerated oocytes did not differ among experimental groups (36,5%; 35,0% and 21,3% for FSHbov, FSHeq and FSHeq+eGH respectively). By the time the analysis of cytoplasmatic morphology was done in the exp II, only the addition of FSHeq in the HTF:BME media resulted on a highly expressive improvement on cytoplasmatic morphology, represented for signs of maturation like the ones found. After OT one mare of FSHbov group and one of FSHeq+eGH group become pregnant with one embryonic vesicle each, which represents 10 and 6,8% embryonic vesicle per mare, respectively. This data shows that the percentage of competent in vitro matured oocytes are still low. in in vivo matured oocytes.

Key Words: culture media, equine, maturation, oocyte and oocyte transfer

INTRODUÇÃO

Ao nascimento as fêmeas mamíferas possuem, em seus ovários, ovócitos no estágio de diplóteno da prófase I da meiose. Estes ovócitos não possuem habilidade de reassumir a meiose, ou de sofrerem fertilização; permanecendo no estágio de imaturidade conhecido como núcleo dictiado, ou vesícula germinativa (VG) (DOMNS, 1990; BUEHR, 1994; SATHANANTHAN, 1994).

No interior do folículo, estes ovócitos estão envoltos por células da granulosa, formando o complexo *cumulus* ovócito (CCO). O conjunto de células próximas da zona pelúcida, que estão em íntimo contato com o ovócito por junções intercomunicantes do tipo *gap* é denominado de corona radiata. Essas células do *cumulus* têm função diferenciada daquelas presentes na parede folicular em consequência do seu íntimo contato com o ovócito. Substâncias reguladoras produzidas pelo ovócito têm função importante na atividade das células do *cumulus* e, da mesma maneira, componentes dessas células somáticas têm participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos ovócitos (MARCOS et al., 1996).

O processo de maturação que resulta na aquisição da capacidade de ser fertilizado ocorre em duas fases. A primeira é conhecida como fase de crescimento e confere ao ovócito a capacidade de reiniciar a meiose (CRAN & MOOR, 1990) e regular a síntese de proteínas e formação de organelas, diferenciando a célula em um gameta funcional. A segunda fase, caracterizada pelo reinício da meiose é normalmente denominada de maturação final e ocorre após a puberdade no folículo pré-ovulatório (SCHULTZ, 1986; PAYNTON & BACHVAROVA, 1990; EPPIG, 1991).

O ovócito é uma célula especial por possuir a habilidade de, após a fertilização, dar origem a um novo indivíduo. Antes de adquirir esta habilidade esta célula deve sofrer uma série de transformações seqüenciais que resultam na ovulação de um ovócito totalmente maturo e capaz de ser fertilizado (MASUI & CLARKE, 1979). A maturação ovocitária envolve modificações nucleares e citoplasmática, e é um processo regulado pela combinação de influência extracelular das células foliculares, hormônios esteróides, gonadotrofinas e fatores de crescimento (CRAN et al., 1980; MOOR et al., 1981; SATHANANTHAN, 1994).

O processo de fertilização, da maneira como ocorre no oviduto, é extremamente complexo e envolve interações específicas entre os gametas masculinos e femininos para formar um indivíduo diplóide; o zigoto, o qual em seu devido tempo, irá se desenvolver até um novo ser. O termo fertilização *in vitro* tem sido adotado como uma forma genérica para expressar os processos que incluem a maturação (MIV), a fertilização (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV). Hoje em dia o termo produção *in vitro* (PIV) de embriões tem sido utilizado para definir os três processos (MIV, FIV e CIV) normalmente desenvolvidos em seqüência para produção de embriões exclusivamente *in vitro*. A produção *in vitro* de embriões tem sido utilizada em humanos em todo o mundo, na tentativa de solucionar problemas de infertilidade tanto masculina como feminina, sendo esta também, a principal indicação para o uso destas técnicas em eqüinos (SQUIRES et al., 2003).

Em eqüinos os progressos envolvendo o estudo dos eventos precoces da fertilização tem sido lentos quando comparados a outras espécies de animais domésticos. Tentativas de fertilizar ovócitos eqüinos *in vitro* tem levado a sucesso relativo. O sucesso da produção *in vitro* de embriões depende de uma série de fatores como: disponibilidade de ovócitos imaturos saudáveis, métodos de MIV e capacitação espermática eficientes e condições ótimas de cultivo. Os índices de sucesso de etapas individuais que envolvem a PIV em eqüinos ainda estão longe de permitirem a utilização destas técnicas em protocolos de rotina, como acontece em bovinos (PARRISH et al., 1986; XU et al., 1987).

Os únicos potros nascidos após procedimentos *in vitro* no eqüino são originados da fertilização de um ovócito maturado *in vivo* com sêmen eqüino capacitado com Ca^{++} ionoforo A23187 (PALMER et al., 1990) e da injeção espermática intracitoplasmática de um espermatozóide em ovócitos eqüinos maturado *in vitro* (SQUIRES, 1996; COCHAN et al., 1998).

As condições para a maturação *in vivo* do ovócito eqüino são diferentes daquelas observadas em outros animais domésticos; pois não ocorre um pico pré-ovulatório de Hormônio Luteinizante (LH), mas sim um aumento progressivo dos níveis deste, o qual permanece vários dias, atingindo concentrações máximas um dia após a ovulação (WHITMORE et al., 1973; IRVINE et al., 1994). As condições para a maturação *in vitro* também parecem ser diferentes, e a utilização de meios de

cultivo clássicos adaptados de trabalhos em bovinos tem resultado em baixos índices de maturação (OKOLSKI et al., 1991; BEZARD & PALMER, 1992). As razões para a falha do ovócito eqüino em atingir a completa maturação *in vitro* ainda não são totalmente conhecidas (GOUDET et al., 1998a).

Hoje, as técnicas de reprodução assistida em eqüinos incluem a Inseminação Artificial e a Transferência de Embriões. No entanto, com a utilização destas técnicas é impossível se obter gestações em éguas com problemas de subfertilidade e de animais que venham a óbito. Como visto, a PIV ainda não é uma realidade na reprodução eqüina. Portanto a Transferência de Ovócitos (TO), que é uma técnica de reprodução assistida, na qual o ovócito já maturado (*in vivo* ou *in vitro*) é transferido ao oviduto de uma égua receptora. Esta então é inseminada permitindo que a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorram no seu trato reprodutivo (CARNEVALE et al., 2001), possibilitando a obtenção de gestações de animais mortos e éguas sub-férteis com diferentes patologias e histórico de insucesso repetido em programas de transferência de embriões.

A TO eqüinos maturados *in vitro* pode ser utilizada como uma forma de determinar a viabilidade ovocitária (ZHANG et al., 1989; CARNEVALE & GINTHER, 1993; HINRICHS et al., 1997; HINRICHS et al., 1998a; HINRICHS et al., 1998b; HINRICHS et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000), visto que parâmetros nucleares e citoplasmáticos são indicadores do desenvolvimento ovocitário, mas não refletem o desenvolvimento da competência para a fertilização e desenvolvimento embrionário e fetal, tendo assim esta técnica um importante papel em aumentar o conhecimento ainda básico da maturação e fertilização de ovócitos eqüinos (CARNEVALE, 1996).

Visto que a maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos, um dos passos fundamentais para a Produção *in vitro* (PIV), não está totalmente elucidada, o objetivo de presente trabalho foi o de avaliar o estágio de maturação nuclear e a morfologia citoplasmática de ovócitos de eqüinos, após o cultivo *in vitro* em diferentes meios. Analisou-se também se a utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas e hormônio de crescimento poderiam melhorar as taxas de maturação nuclear e citoplasmática, bem como a capacidade dos ovócitos de eqüinos em serem fertilizados e passarem pelo desenvolvimento embrionário e fetal após realização de Transferência de Ovócitos.

OBJETIVOS

Tendo em vista o estado presente de conhecimento sobre a maturação ovocitária *in vitro* na espécie eqüina, este trabalho teve como objetivos:

Experimento I

1. Comparar as taxas de maturação nuclear de ovócitos eqüinos cultivados em três diferentes meios: “Tissue Culture Media –199” (TCM 199), “Sintetic Oviductal Fluid” acrescido de aminoácidos (SOFaa) e “Human Tubal Fluid”: “Basal Medium Eagle” (HTF:BME).
2. Verificar com a utilização da Microscopia Eletrônica de Transmissão a morfologia citoplasmática dos ovócitos maturados *in vitro* nos três meios de cultivo testados, comparando com ovócitos eqüinos imaturos.

Experimento II

1. Avaliar se a adição de diferentes fontes de gonadotrofinas e hormônio de crescimento eqüino ao meio HTF:BME, poderia interferir nas taxas de maturação nuclear.
2. Verificar pela Microscopia Eletrônica de Transmissão, se a utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas e hormônio de crescimento eqüino poderiam melhorar a qualidade dos ovócitos maturados *in vitro* em meio HTF:BME.
3. Avaliar pela Transferência de Ovócitos à capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário e fetal dos ovócitos maturados *in vitro*, com diferentes fontes de gonadotrofinas e hormônio de crescimento eqüino.

REVISÃO DA LITERATURA

MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

A habilidade de ser fertilizado depende de uma maturação ovocitária normal, tanto nuclear quanto citoplasmática. A maturação nuclear pode ser facilmente identificada pela configuração cromossômica. A maturação citoplasmática, a qual é necessária no desenvolvimento pós-fertilização, é pouco avaliada (HINRICHS et al., 1995).

O processo de maturação ovocitária deve conferir ao ovócito a capacidade de ser fertilizado e de se desenvolver em um novo indivíduo ocorrendo em duas fases. A primeira é conhecida como fase de crescimento e confere ao ovócito a capacidade de reiniciar a meiose (CRAN & MOOR, 1990). O ovócito primário (15 a 20µm de diâmetro) é ativado provavelmente pela transmissão de sinais estimulatórios diretamente pelas células do *cumulus*. A ativação ovocitária causa uma intensa atividade transcripcional de Ácido Ribonucleico (RNA), a qual excede a necessidade momentânea do ovócito. Desta forma a maior parte deste RNA não é traduzido e sim estocado no citoplasma sob uma forma estável (sem a poliadenilação que é requerida para tradução). Imediatamente antes e após a fertilização ocorre a tradução das informações contidas no RNA dando suporte a finalização da meiose e ao desenvolvimento embrionário (PAYNTON & BACHVAROVA, 1990; CRAN & MOOR, 1990). Desta maneira, durante esta fase de crescimento a alta atividade de transcrição acumula macromoléculas e a pequena quantidade de RNA que é traduzida, suporta e regula a síntese de proteínas e a formação de organelas, tais como: mitocôndrias, ribossomos, grânulos corticais e vesículas contendo fontes energéticas, diferenciando a célula em um gameta funcional (SCHULTZ, 1986; PAYNTON & BACHVAROVA, 1990; EPPIG, 1991). Durante esta fase de crescimento a célula germinativa feminina apresenta um aumento de cinco vezes em seu diâmetro (100 a 120µm de diâmetro), permanecendo no estágio meiótico de diplóteno ou vesícula germinativa na prófase I (SCHULTZ, 1986; DOWNS, 1990).

Uma das alterações mais surpreendentes durante a fase de crescimento de um ovócito é a secreção de uma membrana glicoproteica, denominada zona pelúcida (ZP), que forma um revestimento protetor ao redor do ovócito, o qual consiste de 3 glicoproteínas, ZP1, ZP2 e ZP3. Em contraste com a expressão de ZP1 e de ZP3, a expressão de ZP2 já ocorre em folículos primordiais. Estas proteínas da zona são essenciais para o desenvolvimento folicular normal e sua expressão exige o fator de transcrição (SOYAL, et al., 2000). As células da granulosa tornam-se não somente acopladas umas às outras, mas também, via prolongamentos, atravessam a ZP em desenvolvimento, formando junções *gap* com o oolema (ANDERSON & ALBERTINI, 1976).

A segunda fase, caracterizada pelo reinício da meiose, é normalmente denominada de maturação final e ocorre após a puberdade no folículo pré-ovulatório. Esta fase envolve modificações nucleares e citoplasmática que irão resultar na formação de um gameta com capacidade de ser fertilizado (CRAN et al., 1980; MOOR et al., 1981; SATHANANTHAN, 1994). Entende-se como maturação nuclear as mudanças que ocorrem no núcleo do ovócito, mais especificamente a duplicação e divisão do ácido desoxirribonucleico (DNA) e é iniciado pela condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear. Este processo também é conhecido como quebra da vesícula germinativa (QVG). Ocorre a duplicação dos centríolos e os cromossomos, em pares diplóides, que encontravam-se livres no citoplasma, migram para região equatorial (metáfase I). O ovócito primário sofre então duas divisões meióticas. Na primeira divisão, duas células filhas são formadas, mas uma delas contém quase todo citoplasma e constitui o ovócito propriamente dito. A outra, muito menor, é expulsa para o espaço perivitelino, sendo conhecida como corpúsculo polar (CP), que além de cromossomos, contém uma variedade de organelas, incluindo mitocôndrias, ribossomos e grânulos corticais. O ovócito agora é considerado secundário. Inicia-se então o segundo período de repouso da divisão meiótica que só será completada com a penetração espermática e extrusão do segundo corpúsculo polar e finalização da meiose (GORDON, 1994).

O reinício da meiose depende de uma série de fatores externos. Em mamíferos a maturação ovocitária é estimulada pela retirada da influência inibitória das células foliculares. A adição de hormônios (ou remoção do ovócito do interior do folículo) é seguida por um período latente, de duração variável entre as espécies.

Este período corresponde à transdução do sinal hormonal. Sendo assim a ocorrência da maturação meiótica é acompanhada e provavelmente regulada por mudanças no padrão de fosforilação de várias proteínas celulares. Um componente importante é a atividade do fator promotor de maturação (MPF) (MASUI & MARKERT, 1971), o qual acredita-se ser um regulador universal do ciclo celular, tanto na mitose como na meiose (NURSE, 1990). O MPF é uma proteína composta por uma subunidade catalítica, a cinase 1 dependente de ciclina (cdk1, também conhecida por p34^{cdc2}) e uma subunidade reguladora, a ciclina B (DOWNS, 1993; TAIEB et al., 1997). O MPF ativo induz a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do envelope nuclear (QVG) e a reorganização do citoplasma para entrada na fase M tanto do ciclo mitótico como meiótico (MURRAY, 1989; MURRAY & KIRSCHNER, 1989; MOTILIK & KUBELBA, 1990). Em ovócitos de vertebrados, o fuso da meiose I se organiza, e leva a uma divisão desigual correspondente a expulsão do primeiro corpúsculo polar, em paralelo com um decréscimo na atividade do MPF. A atividade do MPF aumenta novamente, induzindo a formação imediata do fuso da segunda divisão meiótica, sem a reorganização do envelope nuclear, descondensação dos cromossomos e replicação de DNA. Os ovócitos ficam então parados no estágio de metáfase II, com altos níveis de MPF até o momento da fertilização (HASHIMOTO & KISHIMOTO, 1988; CHOI et al., 1991; NAITO & TOYODA, 1991; JELINKOVA et al., 1994; DEDIEU et al., 1996; TAIEB et al., 1997; WU et al., 1997). Outras cinases também estão envolvidas na regulação dos eventos meióticos, como a Proteína Quinase Mitógeno Ativada (MAPK).

A maturação citoplasmática é caracterizada por diversas mudanças no formato e localização das organelas celulares. Estas estão intimamente relacionadas com a aquisição da competência meiótica e com a capacidade do ovócito ser fecundado e sofrer desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 1989).

Em bovinos, os trabalhos realizados com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão por Hyttel et al. (1989) demonstraram que, no ovócito imaturo, as vesículas com membrana são encontradas no citoplasma em grande número e com uma distribuição homogênea. As mitocôndrias se localizam em grupos na periferia do ovócito, assim como os grânulos corticais. Um atraso na distribuição periférica dos grânulos corticais indica incoordenação entre a maturação nuclear e citoplasmática (IZADYAR et al., 1997). Na periferia encontram-se também os

complexos de Golgi bem desenvolvidos. No ovócito maturo, as mitocôndrias apresentam-se uma distribuição uniforme e não periférica, enquanto que os grânulos corticais (GC) se encontram mais dispersos e ligados ao sistema retículo endoplasmático liso (REL), ao contrário dos ovócitos imaturos. Os complexos de Golgi apresentam um menor desenvolvimento, ou seja, apresentam-se em estágio inativo (HYTTEL et al., 1989).

Cran (1985), trabalhando com ovócitos suínos, definiu as mitocôndrias, as gotas lipídicas e as grandes vesículas rodeadas por membranas como as estruturas de maior importância a serem observadas para avaliar a maturação citoplasmática. A fração volumétrica das mitocôndrias aumenta nos ovócitos maduros de suíno em relação aos imaturos, sendo que estas apresentam a forma de ferraduras com poucas criptas (CRAN, 1985). As gotas lipídicas, apresentam-se de cor cinza nos ovócitos imaturos e de cor cinza com listras nos maduros. Estas representam de 10 a 20% do volume do ovócito e podem estar relacionadas e, às vezes, encapsuladas pelo REL (CRAN, 1985). Ghadially (1988) estabeleceu que as gotas lipídicas podem ser visualizadas na microscopia eletrônica medianamente eletrolúcidas ou podem apresentar um halo eletrolúcido em volta. Segundo o autor o halo pode estar presente devido a composição dos ácidos graxos, em sua maioria ácidos graxos insaturados ou a metabolização das mesmas, já que é realizada da periferia para o centro. As vesículas com membrana ocupam 15% do volume do ovócito e esta porcentagem diminui com o processo de maturação citoplasmática. Elas apresentam-se como corpos eletrolúcidos com conteúdo amorfo e membranoso e em íntima relação com o REL (GHADIALLY, 1988). O complexo de Golgi está em disposição periférica, e pode se apresentar unido a vesículas ou GC. Os grânulos corticais são responsáveis por uma das barreiras à polispermia, e apresentam-se próximos a membrana celular (CRAN, 1985).

Na maturação ovocitária, a quebra das relações entre o ovócito e as células da granulosa adjacentes resulta em mudanças na atividade ovocitária. Esta atividade está relacionada com um rearranjo dos compartimentos celulares e migração das organelas citoplasmáticas para a periferia em direção a região cortical. Existe uma associação entre as mitocôndrias e o REL, formando um microambiente o qual facilita a troca de metabólitos intermediários entre as duas organelas (FLEMMING & SAACKER, 1972), que passam a utilizar os lipídeos estocados sob a

forma de gotas lipídicas como uma importante fonte de nutrientes e energia para a maturação final e fertilização do ovócito até as clivagens iniciais. O rearranjo entre estas organelas parece ser essencial na produção de adenosina trifosfato nos eventos celulares da maturação ovocitária pré-ovulatória

Resumidamente, as alterações na ultraestrutura que ocorrem durante a maturação final em bovinos são o desenvolvimento de um estoque lipídico, a redução nos complexos de Golgi, o alinhamento dos grânulos corticais responsáveis pelo bloqueio à poliespermia (HYTTEL et al., 1997), o aparecimento de numerosos ribossomos, especialmente nas adjacências dos cromossomos e a redistribuição das mitocôndrias (KRUIP et al., 1983).

A maturação pode ser inibida por componentes secretados pelas células somáticas e isto é evidenciado quando os Complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) liberados de seus folículos reiniciam a meiose. Estímulos hormonais podem promover a maturação do ovócito mesmo tendo contato com os componentes inibitórios secretados pelas células somáticas. Eppig & Downs (1987) sugerem que a inibição meiótica pode ser mantida por substâncias transferidas diretamente das células da granulosa para as células do *cumulus oophorus* e para o ovócito pelas uniões intercelulares, ou pela secreção do líquido folicular a partir das células da granulosa. Esta comunicação bidirecional permite a transferência de nutrientes, precursores metabólicos (como aminoácidos e nucleotídeos), moléculas de informação (como hormônios, neurofinas e fatores de crescimento) e sinais meióticos inibitórios e estimulatórios. Deste modo ou pelo contato célula-célula na superfície celular, o ovócito em crescimento pode promover ativamente o crescimento e a diferenciação das células foliculares, enquanto as células da granulosa são capazes de assegurar o crescimento e diferenciação do ovócito (EPPIG & DOWNS, 1987).

FATORES QUE INFLUENCIAM A MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

Os fatores que podem influenciar a maturação ovocitária incluem as condições físicas como osmolaridade e composição iônica (YAMAUCHI et al., 1999), temperatura, pH, tensão de CO₂ e O₂ assim como volume de cultura, presença de células do *cumulus*, adição de gonadotrofinas ao meio de maturação e o tempo de cultivo dos ovócitos. Foi comprovado em humanos (KENNEDY & DONAHUE, 1969) e, em coelhos e vacas (ROBERTSON & BAKER, 1969) que a presença das células da granulosa durante a maturação é benéfica. A associação entre as células germinativas e somáticas regula os níveis de síntese e o padrão de fosforilação de proteínas específicas no ovócito em crescimento, regulando portanto o metabolismo do mesmo.

Características macroscópicas do folículo são importantes para determinar o potencial de maturação nuclear e citoplasmática do ovócito. Ovócitos presentes em folículos menores que 2 mm de diâmetro na espécie bovina, geralmente não são competentes para reiniciarem a meiose, pois não completaram sua fase de desenvolvimento e síntese de RNA (HAWLEY et al., 1995). A influência do diâmetro do ovócito na progressão da maturação nuclear e produção de embriões *in vitro* foi bem explorada por Hyttel et al. (1997). Os resultados descritos pelo grupo de pesquisadores foram bastante similares e sugerem que o ovócito adquire a competência para reiniciar a meiose quando seu diâmetro atinge 110-115µm. Entretanto, o potencial de desenvolvimento embrionário se estabelece mais tarde quando o ovócito alcança um diâmetro de 120µm. O crescimento do ovócito e do folículo são eventos paralelos, de modo que o ovócito atinge 110µm quando seu folículo atinge 3mm, e o diâmetro de 120µm para o ovócito será encontrado em folículos maiores de 3mm.

Na maioria das espécies de mamíferos, a competência meiótica, definida pela habilidade de prosseguir e concluir a meiose, é dependente e aumenta com o tamanho folicular, mas não é estritamente ligada ao diâmetro ovocitário (TROUNSON, et al., 2001). Em todas as espécies de não-roedores pesquisadas, a habilidade dos ovócitos em retomar a meiose é adquirida quando o crescimento

ovocitário está completo, isto é, quando o diâmetro é de cerca de 9-13% do diâmetro ovulatório (GILCHRIST, et al., 1995). Em humanos, o tamanho mínimo do diâmetro folicular para que seja realizada maturação *in vitro* é de 5mm (WYNN, et al., 1998). Em vacas, folículos de 6mm possuem potencial cerca de duas vezes superior ao de ovócitos de folículos antrais menores. Em espécies monovulatórias, somente um ou dois folículos aumentam grandemente e tornam-se dominantes durante sua seleção na fase de crescimento final, o que leva a um marcante aumento da proporção entre estrógeno/andrógeno no(s) folículo(s) dominante(s). No entanto, o tamanho do folículo dominante não afeta os ovócitos vizinhos em relação à sua capacidade de fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (TROUNSON et al., 2001; WITTMACK et al., 1994). Estes dados sugerem que a competência para o desenvolvimento de ovócitos maturados *in vitro* é mais comprometida por algumas falhas inerentes, mas ainda não identificadas, durante o processo de maturação do que diretamente relacionada ao reduzido tamanho folicular.

Tratando-se de atresia folicular, o complexo *cumulus*-ovócito é a última porção do folículo que é afetada pela atresia e, mesmo em estados avançados de atresia folicular, apenas 25% dos complexos apresentam sinais claros de degeneração. Folículos com mais de 73% de células apoptóticas ainda podem oferecer ovócitos competentes (HAWLEY et al., 1995). Estágios iniciais de atresia folicular não afetam negativamente o potencial do ovócito e, pelo contrário, parecem estimular a competência do ovócito para desenvolver-se. A competência do ovócito somente será comprometida por estágios avançados de atresia (BLONDIN & SIRARD, 1995).

Deve ser considerada que a diferença entre folículos subordinados e dominantes parece ter reflexo na capacidade do ovócito em progredir até a clivagem e sustentar o desenvolvimento embrionário. Ovócitos aspirados de folículos um pouco antes do pico ovulatório de LH têm maior capacidade de desenvolvimento até blastocisto do que aqueles com diâmetro entre 2 e 6mm. Provavelmente, a permanência do ovócito no folículo desde a divergência folicular até a ovulação é importante para completar o fenômeno denominado de capacitação do ovócito (BRUCK et al., 1999). Na prática, os folículos entre 2 e 8mm têm sido utilizados para a maturação *in vitro* em decorrência do número disponível no ovário e da dificuldade de determinar os ovócitos que estão capacitados antes da fertilização para espécie

bovina. Métodos mais eficazes para capacitação de ovócitos *in vitro* devem ser desenvolvidos para incrementar os índices de produção de embriões (VAN DE LEMPUT et al., 1999).

O ovócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do CCO. Morfologicamente, os ovócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ovoplasma homogêneo com granulações finas, de coloração marrom e completamente envolvidos por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta. Entretanto, há grandes variações quanto aos padrões morfológicos de qualidade de ovócito entre as espécies. Por exemplo: ovócitos viáveis de camundongos apresentam ovoplasma claro, quase sem granulações, enquanto que eqüinos, suínos e cães, observa-se ovoplasma escuro e as granulações podem apresentar-se de forma heterogênea devido a quantidade e distribuição dos lipídeos citoplasmáticos (CARNEIRO et al., 2002a).

A maturação meiótica *in vivo* de ovócitos mamíferos é conhecida por ser regulada por gonadotrofinas. Brackett et al. (1989), demonstraram que a utilização de LH bovino no meio de maturação *in vitro* aumentou significativamente a qualidade embrionária. Há evidências de que o LH altere a distribuição citoplasmática de cálcio, e que a gonadotrofina promova um aumento da glicólise, combinado a um aumento da oxidação mitocondrial de glicose, aumentando o metabolismo da glutamina (ZUELKE & BRACKETT, 1992; 1993).

A inibição da secreção de LH ou a inativação do receptor de LH resulta na interrupção da maturação ovocitária e na falha da ovulação. Devido ao fato de que não foram identificados receptores de LH em ovócitos, os sinais estimulatórios para a maturação ovocitária originam-se das células da granulosa no folículo. Está bem caracterizado que os folículos respondem à onda de LH com a alteração da produção de esteróides pelas células da granulosa, partindo de um ambiente predominantemente estrogênico para um progesterônico e com a produção de hialuronidase pelas células do cumulus, esta última ação levando a mucificação e expansão das células do cumulus e da concomitante finalização dos contatos juncionais ovócito-cumulus (PICTON et al., 1998). A quebra destas junções gap significa o desaparecimento de uma eficiente e coordenada comunicação bi-

direcional entre o ovócito e as células somáticas ao seu redor. Apesar das diferenças espécie-específicas, o mecanismo molecular básico que governa o processo da maturação ovocitária em resposta à onda de LH, divide muitas vias regulatórias, como a alteração dos níveis de fosforilação de proteínas, adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e níveis de cálcio (PICTON et al., 1998).

Muitos trabalhos sugerem que o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) tenha um efeito benéfico e que a presença de gonadotrofinas melhore a expansão das células do *cumulus*, e conseqüentemente promova melhoras na capacitação espermática e na fertilização (EYESTONE & BOER, 1993). Segundo Bevers et al. (1997), somente o FSH e não o LH influencia a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Informações contraditórias seriam devido a contaminação do LH utilizado em pesquisas com FSH, na ordem de 0.1%.

Quanto aos Hormônios Esteróides (HE), sabe-se que no bovino o pico de LH leva a um aumento na concentração folicular de HE, e que esta concentração diminui com o decréscimo de LH. Tsafiri et al. (1972) demonstraram que a Quebra da Vesícula Germinativa não é afetada pela inibição da síntese de esteróides, e que a ação do LH no reinício da meiose não é induzido pela síntese de HE. No entanto estes parecem ser necessários para a progressão da metáfase I e II.

O Fator Promotor de Maturação é composto de duas subunidades; uma catalítica, constituída por uma proteína de 34 kD, a p34^{cdc2} (controle da divisão celular), e uma reguladora, formada por uma proteína de 45 kD, a ciclina B. Em sua forma inativa, a p34^{cdc2} é fosforilada em treonina 161, treonina14 e tirosina 15 pela fosfatase cdc 25. O MPF apresenta forte afinidade pela histona H1 quinase como substrato, a qual tem sido utilizada para demonstrar a atividade do MPF. Em ovócitos bovinos, a histona H1 quinase está em baixo nível no estágio de vesícula germinativa e, subseqüentemente, ocorre aumento gradativo, atingindo o máximo no estágio de metáfase I (MI). Após esse pico, os níveis de histona H1 quinase (atividade de MPF) têm diminuição abrupta, coincidindo com os estádios da anáfase I (AI) e telófase I (TI). Um outro aumento na atividade do MPF é observado no estágio de metáfase II (MII). Esses níveis elevados são mantidos várias horas após a maturação do ovócito e, gradativamente, diminuem após 30 horas da maturação ou, abruptamente, na fecundação ou ativação do ovócito (GOUDET et al., 1998a).

Em mamíferos, existem evidências de que vários eventos durante a maturação de ovócitos ocorram também sob a regulação da MAP quinase (MAPK) também denominada de ERK (extracelular regulated kinase). A MAPK é ativada em consequência da fosforilação em resíduos específicos de tirosina e treonina durante a maturação de ovócitos. Em murinos, duas isoformas de MAPK, p42-ERK2 (42kDa) e p44-ERK1 (44kDa), foram identificadas. Em bovinos, a MAPK é ativada no rompimento da vesícula germinativa, atinge a atividade máxima em MI e permanece elevada até a formação dos pronúcleos, não diminuindo em MII. Esses dados sugerem que a MAPK é importante para manter a MII e entrar em interfase (GOUDET et al., 1998a).

Várias seqüências nesse processo, desde o desencadeamento da QVG até o bloqueio em MII, não são completamente elucidadas. Por exemplo: não é conhecido o sinal que desencadeia a ativação do MPF e da MAPK, reiniciando a meiose em ovócitos de mamíferos. O ovócito de muitas espécies é mantido em G2 pelo AMPc que tem função inibitória na maturação nuclear em ovócitos de camundongos, bovinos e suínos, mas não de ovinos. Em bovinos, o AMPc induz uma inibição temporariamente curta na vesícula germinativa, não impedindo a progressão até MI (GOUDET et al., 1998b).

Após maturação, os ovócitos são mantidos em MII até a fecundação ou ativação partenogenética. Existem evidências que os ovócitos são mantidos em MII por ação de fatores citostáticos (CSF) que são capazes de manter a atividade elevada do MPF. O CSF é composto por MAPK e c-mos protooncogene (Mos quinase). Mos é uma serina/treonina quinase encontrada somente no estágio de MII em ovócitos bovinos e é um ativador da MAPK (GOUDET et al., 1998b).

O produto do fator c-mos proto-oncogene (Mos) é a chave reguladora da maturação ovocítica em diferentes espécies, e sua tradução representa um exemplo clássico de como a expressão dos genes pode ser regulada pela poliadenilação citoplasmática do RNA mensageiro (RNAm) (RICHTER, 1996). Mos é o produto de um RNAm materno estocado no citoplasma durante a fase de crescimento ovocítica. Ele é traduzido durante a maturação e degradado junto com muitos outros RNAs em estágios posteriores de desenvolvimento (GEBAUER et al., 1994; PARIS & RICHTER, 1990). O produto Mos tem a habilidade de ativar a cascata de quinases

protéicas ativadas por mitógenos (MAPK), que media a atividade do MPF. O Mos pode atuar diferentemente nos estágios de desenvolvimento, podendo comportar-se como ativador na metáfase I e como inibidor na metáfase II, dependendo das estruturas e da bioquímica em contexto (GALLICANO et al., 1997). Hoje está claro que a distribuição do RNAm no citoplasma ovocítico não é uniforme e que a assimetria é necessária para o funcionamento celular normal (ST. JOHNSTON, 1995).

Existem fatores de crescimento produzidos nos ovários que estão envolvidos na regulação da maturação nuclear e na expansão das células do *cumulus*. Os fatores de crescimento relacionados com a maturação ovocitária são o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento semelhante a Insulina I e II, (Insulin like factor I e II / IGF-I e IGF-II), $TGF\alpha$ e $TGF\beta$ (Transforming growth factor α e β). O EGF reduz a atividade da adenilato ciclase e aumenta a atividade da fosfodiesterase, diminuindo assim os níveis de AMP cíclico nas células da granulosa, o que impede a indução de receptores para o LH pelo FSH (TSAFARI & ADASHI, 1994). Estudos realizados com camundongos demonstram que o EGF estimula a QVG em ovócitos e induz a expansão do *cumulus oophorus* (BUCCIONE et al., 1990). O EGF pode atuar como regulador intra-ovariano da maturação em resposta ao estímulo da gonadotrofina (ROY & GREENWALD, 1990) e desempenhar um papel na cascata bioquímica envolvida no ciclo meiótico, levando a ativação da Proteína Quinase Mitógeno Ativada (MAPK).

Em bovinos, Lorenzo et al. (1994) observaram que o EGF atua estimulando a maturação em Complexo *cumulus* Ovócito (CCO), mas não em ovócitos sem células do *cumulus*. Quanto ao IGF-I receptores foram detectados tanto no ovócito quanto nas células do *cumulus*, e já foi demonstrado previamente por Adashi et al. (1985), May et al. (1988) e Xia et al. (1994) que o IGF-I modula uma variedade de funções das células foliculares somáticas como a proliferação, diferenciação e a esteroidogênese (CARNEIRO et al., 2002b). Pesquisas mostraram que a expansão das células do *cumulus* ocorre por influência deste fator de crescimento, e que o IGF-I possa ser produzido endogenamente pelos CCOs (SINGH & ARMSTRONG, 1997). Assim, inúmeros hormônios, fosfatases e quinases estão envolvidos no

processo de regulação da maturação de ovócitos bovinos, processo que não está completamente elucidado.

MATURAÇÃO DO OVÓCITO EQUINO

Na última década, biotecnologias alternativas tem apontado para pesquisas, na produção de uma progênie de éguas selecionadas. A superovulação não tem sucesso estabilizado na égua (McCUE et al., 1993; PALMER et al., 1993), assim técnicas de produção *in vitro* tem sido exploradas como uma alternativa na produção de embriões. Estes esforços tem resultado no nascimento de potros a partir da fertilização *in vitro* de ovócitos maturados *in vivo* (PALMER et al., 1990). Considerando que ovócitos eqüinos adquirem competência para fertilização *in vitro* após maturado *in vivo*, o processo de maturação ovocitária parece ser um ponto crítico na produção *in vitro* de embriões eqüinos.

O processo de maturação *in vitro* (MIV) em eqüinos tem sido motivo de investigações por diversos grupos: Fulka & Okolski (1981); Desjardins et al. (1985); Zhang et al. (1989); Okolski et al. (1991); Willis et al. (1991); Bezard et al. (1992); Del Campo et al., (1990); Choi et al., (1993); Hinrichs et al., (1993); Fayer-Hosken et al., (1993); Willis et al. (1994). Estes pesquisadores tem enfatizado a importância do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação, nível hormonal, co-cultura de células, etc. A maioria dos protocolos utilizados para maturação nuclear *in vitro* de ovócitos eqüinos possuem entre seus componentes, hormônios gonadotróficos - LH e FSH, e estradiol. Os protocolos mais utilizados tem se baseado na produção *in vitro* de embriões bovinos. Porém, as taxas de maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos são baixas quando comparadas as de outras espécies, geralmente obtêm-se 40 a 60% ovócitos eqüinos atingindo metáfase II (DELL AQUILA et al., 1997), comparado a 97% em bovinos (SHIOYA et al., 1988).

Apesar dos consideráveis esforços para produzir um sistema de cultivo que realmente induza a completa maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos eqüinos, um sistema ótimo ainda não foi desenvolvido. Atualmente, os ovócitos

eqüinos são incubados em meio TCM 199 acrescido de uma combinação de soros (ou componentes do soro), hormônios, macromoléculas e células somáticas. Baseado na avaliação da configuração cromossômica, a maturação dos ovócitos eqüinos sob estas condições de cultivo resultam em taxas variáveis (30 a 75%), que são tipicamente baixas quando comparadas as taxas de maturação das outras espécies (SQUIRES, 1996).

Os ovócitos quando retirados do folículo sofrem a maturação nuclear espontaneamente. Portanto a principal estratégia utilizada para o desenvolvimento de sistemas de cultivo tem sido a de prover a cultura de condições que suportem e otimizem a maturação nuclear espontânea. No entanto, as condições atuais dos sistemas de cultivo suportam a maturação nuclear espontânea, mas não promovem a maturação citoplasmática do gameta (AGUILAR et al., 2001).

As relações entre as mudanças morfológicas e endocrinológicas do fluido folicular e do ovócito em maturação são pobremente descritas no eqüino. Na maioria das espécies de mamíferos, a maturação nuclear *in vivo* ocorre após o pico pré-ovulatório de LH (DEKEL et al., 1988; SIRARD & FIRST, 1988; HYTTEL et al., 1989; SUN & MOOR, 1991). Na égua não existe um pico de LH pré-ovulatório precedendo a ovulação; em lugar disso, as concentrações de LH aumentam gradualmente durante o estro, alcançando um maior nível no período de um a três dias após a ovulação (GESCHWIND et al., 1975; MILLER et al., 1980).

Em folículos imaturos e pré-ovulatórios menores que 37mm (provavelmente antes do valor máximo de liberação de LH) o núcleo do ovócito é esférico e localizado central ou periférico ao ovoplasma. O espaço perivitelino está ausente e há uma forte união entre ovócito e células do *cumulus*, pelas numerosas junções com o oolema (SZÖLLÖSI et al., 1978; MOOR et al., 1980; MOOR et al., 1981; KRUIP et al., 1983; CRAN, 1985; HYTTEL et al., 1987). As mitocôndrias estão concentradas na região cortical, e em íntimo contato com o retículo endoplasmático formando pequenas unidades metabólicas (ZAMBONI & MASTROIANNI, 1966; FLEMMING & SAAKE, 1972; CRAN et al., 1980; KRUIP et al., 1983; VOGELSANG et al., 1987). O estágio de vesícula germinativa na região central, com nucléolo vacuolizado não é uma característica de ovócitos eqüinos. O nucléolo deste grupo de ovócitos é constituído de dois componentes: uma porção interna fibrilar e densa e

uma auréola fibrilar mais frouxa, observado em bovinos por Flemming & Saacke (1972) e Assey et al. (1994) e, em eqüinos por Volgelsang et al. (1987). O estágio de vesícula germinativa na região central, com nucléolo vacuolizado pode representar um ovócito na fase final de crescimento. Durante a fase de crescimento o nucléolo bovino é fibrino-granular e está ativamente sintetizando RNA. E na fase final de crescimento, exibe uma aparência de alo, e finalmente volta para a massa densa esférica e fibrilar (CROZET et al., 1986). O RNA transcrito é estocado (poliadenilado), e será usado durante a maturação meiótica e no desenvolvimento embrionário inicial até a transição materno embrionária (PAYNTON & BACHVAROVA, 1990) que ocorre no estágio de oito células nos embriões eqüinos (GRONDAHL et al., 1993; BALL et al., 1993; GRONDAHL et al., 1994).

Uma segunda fase de mudanças dinâmicas é a quebra da vesícula germinativa, que depende da liberação gradual das células foliculares. No ovócito eqüino, o espaço perivitelino é marcadamente aumentado, e no seu interior ocorre a finalização dos processos de células do *cumulus* (CRAN et al., 1980).

Uma descrição detalhada das modificações morfológicas que ocorrem no ovócito eqüino foi realizada por Grondahl et al. (1995), os quais utilizaram microscopia eletrônica de transmissão para visualizar o processo. Os autores observaram um achatamento do núcleo esférico do ovócito eqüino, seguido de um aumento da ondulação do envelope nuclear, formação da placa metafásica da primeira divisão meiótica, e finalmente, extrusão do 1º corpúsculo polar e subsequente formação da placa metafásica da segunda divisão meiótica. De acordo com o estágio de maturação nuclear observado utilizando-se microscopia de luz, ovócitos podem ser classificados em: VG (vesícula germinativa) – quando o ovócito apresenta um núcleo esférico localizado central ou perifericamente no ovoplasma.; QVG (quebra da vesícula germinativa) – quando o núcleo do ovócito apresenta carioteca irregular ao redor de cromatina condensada e dispersa ; MI (metáfase I) – caracterizado pela presença dos cromossomos arranjados na placa metafásica e localizados perifericamente no ovoplasma; e MII (metáfase II) – presença dos cromossomos metafásicos na periferia do ovoplasma e do corpúsculo polar no espaço perivitelínico

Nas fases de metáfase I e II além das mudanças nucleares, existem grandes mudanças citoplasmáticas. Uma migração maciça para a região central de mitocôndrias, vesículas e gotas lipídicas resulta no aparecimento de um grande número de grânulos corticais e complexos de Golgi livres na região periférica. Os grânulos corticais são observados somente imediatamente abaixo do oolema na metáfase II. Estas modificações morfológicas são bastante similares às observadas por Enders et al. (1987), em ovócitos em metáfase II recém ovulados, indicando que o ovócito equino completa todo o processo de maturação antes da ovulação.

Volgelsang et al. (1987) e Landim-Alvarenga (2002) demonstraram que, em ovócitos pré-ovulatórios eqüinos, as mitocôndrias estavam localizadas tanto na periferia como próximas ao núcleo, apresentando forma arredondada ou em haltere com poucas cristas não diferindo das observadas em ovócitos imaturos, podendo aparecer junto a grupos de gotas lipídicas. Os grânulos corticais encontravam-se próximos ao complexo de Golgi (menos desenvolvidos que nos ovócitos imaturos), densos com membrana e de tamanho uniforme, mais comumente na periferia do ovócito. As gotas lipídicas são grandes, sem membranas, localizadas em todo citoplasma, e ocasionalmente aparecem unidas às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático liso.

Em eqüinos, Willis et al. (1994), trabalhando com ovócitos imaturos e maturados *in vitro* por 15 horas, descreveram que, enquanto o ovócito imaturo apresenta poucos grânulos corticais e poucas microvilosidades, no ovócito maturo os grânulos corticais apresentam-se esféricos, com forma e tamanho homogêneos, densos e migram até a membrana citoplasmática.

Segundo Carneiro et al. (2002a), o estudo da migração dos grânulos corticais em ovócitos mamíferos é um importante critério para avaliar a maturação citoplasmática. Os ovócitos eqüinos em estágio de VG (imaturos) apresentam grânulos corticais dispersos no citoplasma, e com o decorrer da maturação (30 a 36 horas), ocorre uma progressiva migração centrípeta dos GC em direção do cortex ovocitário, formando uma monocamada adjacente à membrana plasmática (LANDIM-ALVARENGA, 2002). Esta migração cortical têm uma correlação positiva com a maturação nuclear (FRANZ et al., 2002).

A principal característica dos ovócitos de eqüinos independente do seu estado de maturação nuclear é a presença de uma grande quantidade de gotas de lipídeo em associação com mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, apresentando conteúdo amorfo de densidade eletrônica média, sugerindo a formação de unidades metabólicas (FLEMMING & SAACKE, 1972; KRUIP et al., 1983). De fato a observação de algumas gotas sem o conteúdo amorfo e apresentando restos de membrana indica a metabolização do material neles contido, provavelmente colesterol. A aparência diferente do conteúdo presente nos ovócitos maduros, nos quais as gotas aparecem vazias e a associação menos consistente com as mitocôndrias, pode indicar que o processo de maturação demanda a metabolização do conteúdo desta gotas (LANDIM-ALVARENGA, 2002). É conhecido que o retículo endoplasmático liso está envolvido no metabolismo lipídico (ALBERTS, 1989). Esta observação morfológica pode indicar que ovócitos e/ou embriões de eqüinos tem a capacidade de sintetizar colesterol. De fato embriões de eqüinos são capazes de produzir estrógeno durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento (GINTHER, 1992).

Tanto nos ovócitos maduros quanto imaturos foi observada a presença de complexos de Golgi localizado na periferia próximo ao oolema. Entretanto, nos ovócitos imaturos, fixados logo após a colheita, o complexo de Golgi apresentou-se mais desenvolvido, constituído por inúmeras lamelas dilatadas associadas a vesículas membranosas de eletro-densidade variável, tanto na face cis como trans. As da face cis são vesículas recobertas e podem ser as vesículas picnóticas vistas na superfície do ovócito as quais estariam migrando em direção ao Golgi. Neste caso as vesículas da face trans poderiam conter o material absorvido já elaborado pelo Golgi. Como grânulos semelhantes aos grânulos corticais são observados na proximidade desta organela é possível que esta tenha um papel na sua produção. Nos ovócitos maduros, o complexo de Golgi também está presente na periferia do ovócito, mas com tamanho reduzido indicando menor atividade, o que poderia ser explicado por já ter concluído a produção de grânulos corticais (LANDIM-ALVARENGA 2002). Estes resultados corroboram com os de Hyttel et al. (1989) que observaram complexos de Golgi menos desenvolvidos em ovócitos bovinos maduros, quando comparados com os imaturos.

Durante a maturação nuclear e citoplasmática, as células somáticas que envolvem o ovócito também sofrem significativas modificações. As células da granulosa, tanto da camada quanto do *cumulus*, parecem desempenhar importantes funções no crescimento, divisão meiótica e maturação citoplasmática do ovócito. As células do *cumulus*, mas não as da camada, tornam-se suspensas em uma matriz de muco durante a maturação permanecendo separadas em consequência do acúmulo desse muco rico em ácido hialurônico. Hormônios endógenos e fatores produzidos pelo ovócito estimulam a síntese de ácido hialurônico, pelas células do *cumulus*, induzindo a mucificação ou expansão do *cumulus* durante o período da maturação (MARCOS et al., 1996).

Nos ovócitos maduros as junções celulares comunicantes do tipo gap deixam de ser observadas. De acordo com Odor (1981), no folículo pré-ovulatório de rato, os processos das células da granulosa começam a se retrair, e no momento da formação do 1º corpúsculo polar, o espaço perivitelínico se encontra aumentado não sendo mais observadas junções celulares entre as células somáticas e o ovócito. Em mamíferos, a dissociação progressiva das células do *cumulus* do ovócito ocorre em resposta ao estímulo gonadotrófico durante o período pré-ovulatório (GILULA et al., 1978). Aparentemente esta perda de contato é importante para a finalização da maturação citoplasmática e preparação para a fertilização (EPPIG & DOWNS, 1987).

No equino, como em outras espécies, uma nova síntese de proteínas é necessária para a passagem de metáfase I a metáfase II. Isto inclui as proteínas necessárias para completar a Metáfase I - extrusão do corpúsculo polar – e o recomeço da meiose II. A formação da placa metafásica I está associada a uma alta atividade do fator promotor de maturação (MPF) (ALM & TORNER, 1994). A retomada da meiose envolve além da síntese, a fosforilação de proteínas, e a cycloheximide, a qual inibe a peptidil transferase e suprime reversivelmente a maturação ovocitária por bloqueio na síntese de proteínas estágio específicas. São poucos os trabalhos em equinos enfatizando o efeito da supressão meiótica do ovócito. Sabe-se que com a supressão, o ovócito permanece mais tempo na fase de crescimento, acumulando RNA para as fases seguintes (HINRICHS et al., 1995).

Hinrichs et al. (1995) afirmaram que o fluido folicular sozinho não suprime a maturação. Contudo, as células da parede folicular mantém o ovócito no estágio de

vesícula germinativa. A diferença na viabilidade (chegada à metáfase II) após a supressão varia com o grau de expansão do CCO. CCOs expandidos maturam em proporções significativamente maiores. Estudos demonstram que CCO expandidos são normalmente recuperados de folículos atrésicos (HINRICHS, 1991), e que não há diferenças na proporção de células no estágio de vesícula germinativa quando comparado com CCO compactos (HINRICHS et al., 1993) e também não há diferenças na habilidade entre CCOs expandidos e compactos em completarem a meiose (ZHANG et al., 1989; HINRICHS et al., 1993). Porém existe uma diferença significativa no tempo de maturação, no qual CCOs expandidos maturam em 24 horas enquanto CCOs compactos levam aproximadamente 32 horas para maturar (HINRICHS et al., 1993).

As razões para a falha dos ovócitos eqüinos em completar a meiose durante a maturação *in vitro* são desconhecidas, mas podem estar ligadas a uma alteração da cascata bioquímica envolvida na meiose (GOUDET et al., 1998a). As duas subunidades da MPF, p34^{cdc2} e ciclina B e MAPK estão presentes nos eqüinos nos estágios de ovócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*, competentes e incompetentes (GOUDET et al., 1998a). Portanto acredita-se que a falha dos ovócitos eqüinos em completar a meiose não seja pela ausência destas proteínas mas sim, por uma deficiência de reguladores de MPF e/ou uma inabilidade de fosforilar a MAPK.

MATURAÇÃO *IN VITRO* DO OVÓCITO EQUINO

Dados de PIV obtidos com ovócitos provenientes de animais de diferentes espécies demonstram a flexibilidade dos ovócitos em termos de sucesso na maturação, o que confirma a importância de fatores intrínsecos do ovócito na viabilidade nuclear e citoplasmática para a competência meiótica e posterior desenvolvimento embrionário. Em outras palavras, um embrião viável pode ser proveniente de uma ampla gama de condições fisiológicas e endócrinas, desde que, os meios e as condições de cultivo sejam apropriadas à manutenção do metabolismo e da expressão molecular essenciais (VAN BLERKOM & DAVIS, 1998).

A relação anatômica entre o ovócito e a parede folicular, no eqüino interfere com a eficiência dos métodos de colheita. Na égua o folículo apresenta uma camada de células da teca logo abaixo da junção do *cumulus* à parede folicular. Esta estrutura é caracterizada por processos celulares emitidos pelas células da granulosa para o interior da camada de células tecais. Desta forma, os processos das células da granulosa, bem como a posição da camada de células tecais e a estrutura do componente polissacarídeo desta funcionam como uma âncora para o ovócito na parede folicular (HAWLEY et al., 1995).

Vários métodos para obtenção *in vitro* de ovócitos de ovários eqüinos tem sido descritos: aspiração do fluido folicular (FULKA & OKOLSKI, 1981; HINRICHS, 1991; WILLIS et al., 1991; SHABPAREH et al., 1992), dissecação individual dos folículos seguido de isolamento dos CCOs (OKOLSKI et al., 1987; OKOLSKI, 1988; ZHANG et al., 1989; ZHANG et al., 1990; DEL CAMPO et al., 1990; BARRISCO et al., 1992; HINRICHS et al., 1992) e curetagem dos ovários (BEZARD & PALMER, 1992) técnicas trabalhosas e que consomem alto tempo. O número de estruturas coletadas por aspiração é de aproximadamente 1.5 (OKOLSKI et al., 1987) a 2.7 ovócitos por ovário (HINRICHS, 1991). A eficiência na recuperação de ovócitos pode melhorar com repetidas lavagens do folículo (SHABPAREH et al., 1992). As estruturas recuperadas por dissecação dos folículos resultam em 3.1 (ZHANG et al., 1990) a 5.3 ovócitos por ovário (BARRISCO et al., 1992). Recentemente tem sido relatado com sucesso o fatiamento com posterior lavagem de ovários na recuperação de ovócitos *in vitro* obtendo-se até 15 ovócitos imaturos por lavagem. É uma técnica simples e eficiente na recuperação de ovócitos morfolologicamente normais com alto potencial de responder a maturação *in vitro*.

Foram realizadas pesquisas para avaliar se o período entre a colheita dos ovários e o início do cultivo *in vitro* poderia afetar o desenvolvimento dos ovócitos. Na maioria dos trabalhos, o tempo entre a colheita dos ovários e o início do cultivo é de 3 a 5h. Trabalhos realizados comparando níveis de maturação de ovócitos coletados de ovários de 5 a 6h, 6 a 7h, ou de 7 a 8h após a morte do animal comprovam que não existe um efeito significativo negativo do tempo entre a colheita e o início do cultivo na maturação dos ovócitos, nem na expansão do *cumulus oophorus* (SHABPAREH et al., 1993). Similarmente Del Campo et al. (1995), não obtiveram mudanças nas taxas de maturação em cultivos de 3 a 9h e de 10 a 15h.

Resultados contrários foram obtidos por Hochi et al. (1993), que demonstraram baixas taxas de maturação com o aumento do tempo de armazenagem em salina à 30°C. Ovários armazenados por 3 e 6 a 9 horas, tiveram 62.3%, 45% e 30.4% de maturação respectivamente.

Hinrichs et al. (1993) indicaram que no eqüino o tempo de permanência do ovócito no meio de maturação deve ser maior que de outras espécies. Foi demonstrado que 83% dos ovócitos permaneciam no estágio de vesícula germinativa (VG) após 8h de cultivo, e que após 16h, 30% permaneciam no estágio de VG e 55% tinham alcançado metáfase I. Sosnowski et al. (1997) demonstraram que 42.2% de ovócitos chegam a metáfase II após 24h de cultura, 70.4% após 30h, 75% após 36h e 74.4% após 42h de cultura.

A temperatura ideal para o cultivo *in vitro* de ovócitos eqüinos ainda não foi determinada. Okolski et al. (1991) e Meintjes et al. (1995) descreveram temperaturas de 37°C, enquanto Shabpareh et al. (1993) e Willis et al. (1991) determinaram temperaturas de 39°C. A temperatura fisiológica da espécie eqüina varia de 37.5 a 39°C.

A maioria dos métodos utilizados no cultivo de ovócitos eqüinos são provenientes de estudos da maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Okolski et al. (1991); Bezard & Palmer (1992), trabalhando com meios de cultivo, soros, macromoléculas, hormônios e adição de células somáticas, cultivaram *in vitro* ovócitos eqüinos utilizando dois meios: TCM-199 e Menezo B2, não obtendo diferenças significativas na proporção de ovócitos em metáfase II após o cultivo. Shabpareh et al. (1992), compararam a utilização dos meios TCM-199 e Ham's F10 na maturação de ovócitos eqüinos, demonstrando que em 36h após o cultivo o meio TCM-199 apresentava maior porcentagem de maturação (84.6%) em relação ao Ham's F10 23.1%. Com o aumento no tempo de cultura de 36 para 48h, não obtiveram diferença no percentual de maturação entre os dois grupos cultivados.

Willis et al. (1991) determinaram a influência de diferentes tipos de meios e de soros na expansão do *cumulus* na maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos. Os ovócitos foram cultivados em: TCM-199, meio definido e Menezo B2 suplementados com diferentes fontes protéicas: albumina sérica bovina (BSA), soro fetal bovino

(SFB), soro de égua no primeiro dia do estro (SE) ou soro de égua do dia da ovulação (SEO). Os melhores resultados de expansão (100%) foram obtidos com SFB adicionado a qualquer um dos meios de cultura. O tipo do meio não influenciou a maturação nuclear de ovócitos eqüinos, e SFB, SE e SEO produziram um aumento significativo no percentual de ovócitos que atingiram a metáfase II em relação ao BSA.

Quanto às necessidades hormonais no meio de cultivo existem diferentes trabalhos relacionados com as concentrações ideais. Porém devido a grande variabilidade de concentrações que podem ser encontradas nos soros, torna-se difícil estabelecer um protocolo adequado (GORDON & LU, 1990). A maioria dos protocolos utilizados para maturação nuclear *in vitro* de ovócitos eqüinos possuem entre seus componentes hormônios gonadotróficos - LH e FSH, e estradiol. Há evidências de que o LH altere a distribuição citoplasmática de cálcio, e que a gonadotrofina promova um aumento da glicólise, combinado a um aumento da oxidação mitocondrial de glicose, aumentando o metabolismo da glutamina (ZUELKE & BRACKETT, 1992; 1993). Por outro lado, muitos trabalhos sugerem que o FSH tenha um efeito benéfico e que na presença de gonadotrofinas melhore a expansão das células do *cumulus*, o que conseqüentemente levará a melhoras na capacitação espermática e na fertilização (EYESTONE & BOER, 1993).

Zhang et al. (1989) estabeleceram em seus estudos que não existem diferenças na maturação nuclear de ovócitos eqüinos cultivados com 20% de SEO ou com 10% de SFB acrescido de gonadotrofinas para cultivo, e que o LH bovino inibe a maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos, enquanto que o LH eqüino não provoca esta inibição. Bezard & Palmer (1992) demonstraram que as gonadotrofinas eqüinas induzem uma maior porcentagem de maturação ovocitária e expansão do *cumulus oophorus* de ovócitos eqüinos quando comparadas às gonadotrofinas ovinas.

Os hormônios gonadotróficos unem-se a receptores ováricos específicos (nas células do *cumulus*), que levam à ativação da enzima de membrana adenil ciclase, aumentando assim a produção do mensageiro intracelular monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Mckerns (1978) demonstrou que é possível que as gonadotrofinas sejam transferidas para as células alvo nas quais o LH é capaz de

estimular a enzima glicose 6 fosfatase desidrogenase e prover o sustento para a hidroxilação dos esteróides, e que o LH poderia ativar a RNA polimerase. Aparentemente a adição de LH ao sistema de cultivo *in vitro* estimula a formação de AMPc (TSAFRIRI et al., 1972), aumentando, portanto a atividade da proteína kinase responsável pela dissociação da ciclina B e do MPF, permitindo o ovócito reassumir a meiose.

O efeito da Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG) na viabilidade ovocitária *in vitro* foi estudado por Goudet et al. (1998b), devido a similaridade da estrutura molecular do eCG com LH, e da possível necessidade de níveis altos de LH por vários dias para o ovócito eqüino maturar, foi concluído que o eCG circulante está associado com a melhora da competência ovocitária na maturação *in vitro*. As gonadotrofinas exógenas, por exemplo: FSH na presença de Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) afrouxam as conexões entre o ovócito e a parede folicular, facilitando a recuperação dos CCOs (GOUDET et al., 1997b; DUCHAMP et al., 1995).

Para o cultivo de ovócitos eqüinos *in vitro*, têm-se comumente trabalhado com hormônios de outras espécies, dada a dificuldade de se isolar e purificar as gonadotrofinas eqüinas. Bezard & Palmer (1992), utilizando gonadotrofinas de origem ovina, obtiveram menores índices de maturação em relação à utilização de extrato de pituitária eqüina (EPE) na maturação de ovócitos eqüinos. Willis et al. (1991) também obtiveram melhores índices de maturação (Metáfase II) utilizando hormônios eqüinos em relação a bovinos.

TRANSFERÊNCIA DE OVÓCITOS

Recentemente a transferência de ovócitos tem sido uma alternativa para a produção de potros apartir de éguas subférteis, com várias patologias reprodutivas e histórico de insucesso com a transferência de embriões (McKINNON et al., 1988.). A transferência de ovócitos é uma técnica de reprodução assistida em eqüinos na qual o ovócito já maturado (*in vivo* ou *in vitro*) é transferido ao oviduto de uma égua

receptora, que é inseminada permitindo que a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorram no seu trato reprodutivo (CARNEVALE et al., 2001b). Para os programas de pesquisa, a transferência de ovócitos e a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) têm um importante papel em aumentar o conhecimento ainda básico da maturação e fertilização de ovócitos eqüinos (CARNEVALE, 1996).

Na maior parte dos estudos (WILLIS et al., 1991; SHABPAREH et al., 1992; CHOI et al., 1993; DEL CAMPO et al., 1995), as taxas de maturação são baseadas no número de ovócitos que desenvolvem-se até Metáfase II, as vezes associado a avaliação da maturação citoplasmática com migração dos grânulos corticais, formação dos fusos meióticos e integridade da membrana citoplasmática (GOUDET et al., 1997a; GUIGNOT et al., 1999). Parâmetros nucleares e citoplasmáticos são indicadores do desenvolvimento ovocitário, mas não refletem o desenvolvimento da competência. A transferência cirúrgica de ovócitos eqüinos maturados pode ser utilizada como uma forma de determinar a viabilidade ovocitária (ZHANG et al., 1989; CARNEVALE & GINTHER, 1993; HINRICHS et al., 1997; HINRICHS et al., 1998a; HINRICHS et al., 1998b; HINRICHS et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000).

A transferência de ovócitos de doadoras em um programa comercial resulta em taxas de prenhez de 40% aos 16º dia de gestação (CARNEVALE et al., 2001b). Doadoras com mais de 15 anos de idade e com histórico de repetição de cio e falha nos programas de transferência de embriões podem fornecer os seus ovócitos a receptoras saudáveis, obtendo assim uma prole de éguas selecionadas.

Na transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) um baixo número de espermatozóides é necessário para a fertilização em comparação com a inseminação intra-uterina (CARNEVALE et al., 2000). Esta técnica tem apresentado resultados na reprodução de humanos (ASCH et al., 1984) e suínos (RATH et al., 1994). Em eqüinos o primeiro sucesso da GIFT foi em 1998 quando um ovócito e 500 000 espermatozóides foram transferidos ao oviduto de uma égua receptora não cíclica, tratada com hormônios (CARNEVALE et al., 1999). Devido ao baixo número de espermatozóides utilizados e de ambos os gametas serem transferidos diretamente ao oviduto (local de fertilização), esta é uma técnica importante para a reprodução de garanhões subférteis, ou na utilização de sêmen congelado, sexado e/ou de baixa fertilidade (CARNEVALE et al., 1999). Um fator que poderia inviabilizar

a técnica seria a incapacidade destes espermatozóides sofrerem capacitação, impossibilitando a fertilização. McCue et al. (1998) e Carnevale et al. (2000), obtiveram prenhez apartir de GIFT, indicando que a capacitação espermática pode ocorrer no oviduto de éguas receptoras.

A colheita e transferência de ovócitos eqüinos foi primeiramente realizada em 1988 (McKINNON et al., 1988). No entanto, o sucesso da técnica somente foi relatado em 1993 quando Carnevale & Ginther (1993) obtiveram taxas de desenvolvimento embrionário de 92% após a transferência de ovócitos maturados *in vivo*. Carnevale et al. (2000), trabalhando com ovócitos coletados 24h após a administração de hCG e mantidos em estufa a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar por 12h para finalizar a maturação, obtiveram 57% de vesículas embrionárias aos 25ºdia após a transferência.

Taxas de 82% e 10% de gestação foram conseguidas para a transferência de ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro* respectivamente (SCOTT et al., 2001). Zhang et al. (1989) obtiveram 24% de blastocistos recuperados no 8º dia após a transferência de ovócitos maturados *in vitro* (24 a 36h em TCM 199). Ovócitos maturados *in vitro* podem ser transferidos ao oviduto de receptoras resultando no desenvolvimento de embriões. No entanto, as baixas taxas de gestação ou produção embrionária refletem a necessidade de mais pesquisas sobre a maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos (SCOTT et al., 2001).

A utilização de éguas cíclicas na transferência de gametas favorece eventos como o transporte espermático, capacitação e fertilização que são potencialmente sincronizados com os eventos da ovulação, incluindo mudanças nas secreções de esteróides no folículo pré-ovulatório e desenvolvimento de corpo lúteo (PICKETT et al., 1989). Porém, para que estas receptoras possam ser utilizadas deve haver uma sincronia reprodutiva entre doadora e receptora para que ambas estejam na mesma fase do ciclo estral, sob a influência dos mesmos hormônios no momento da transferência. Além disso, a receptora deve ter o seu folículo pré-ovulatório aspirado para que não haja a possibilidade desta vir a gestar um potro que não seja o da transferência de ovócito (PALMER et al., 1997). Desta forma a preparação das receptoras cíclicas dificulta a utilização da técnica. A utilização de receptoras não cíclicas submetidas a terapia com estrógenos e progesterona pode mimetizar as

condições hormonais e morfológicas de uma égua com atividade folicular e assim ser utilizada com sucesso na transferência de gametas (CARNEVALE et al., 2001a).

Na inseminação das éguas submetidas a TO sugere-se que na utilização de sêmen de baixa qualidade ou resfriado, deve-se inseminar a receptora 12h antes e 2h após a transferência (1×10^9 SPTZ/dose). Para sêmen à fresco de garanhões férteis somente 12h antes (2×10^9 SPTZ/dose) é o suficiente para se obter bons índices de prenhez (CARNEVALE et al., 2001a). Um intervalo entre a inseminação e a transferência menor que 12h pode afetar o mecanismo de limpeza uterino devido a redução da motilidade uterina após a cirurgia (WILLIAMSON et al., 1987).

MATERIAL E MÉTODO

OBTENÇÃO DOS OVÁRIOS, COLHEITA E SELEÇÃO DOS OVÓCITOS

Foram utilizados ovários eqüinos provenientes do Frigorífico Rei do Gado, localizado na cidade de Santa Fé – PR, com a distância de 460 Km do Laboratório de Fertilização *in vitro* da UNESP – Botucatu – SP, onde foram realizados os experimentos.

Foram realizadas 10 viagens ao frigorífico, sendo coletados 50 ovários por viagem, perfazendo um total de 500 ovários.

Os ovários tiveram ligamentos e tecidos adjacentes removidos, foram lavados três vezes com solução fisiológica 0,9% (NaCl 0,9%), uma vez com álcool 70° e mais três vezes com solução de NaCl 0,9% e foram transportados por aproximadamente 5 horas em solução de NaCl 0,9% à 20 – 25°C acrescida de 1000 UI de Penicilina, acondicionados em sacos plásticos dentro de caixa térmica até a chegada no laboratório (Figura 1).

No laboratório os ovários foram lavados em solução de NaCl 0,9% à 37°C e mantidos em bequers estéreis. Para a colheita dos ovócitos, os ovários foram fatiados de acordo com a técnica descrita por Choi et al. (1993). Assim os ovários foram cortados em fatias de aproximadamente 5mm de espessura, as quais foram então lavadas com solução de PBS aquecido à 37°C acrescido de 0,1% de Heparina Sódica (5000UI/ml). Após 20 minutos de espera para a sedimentação dos ovócitos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido para placas de Petri onde foi realizada a identificação e dos ovócitos utilizando-se microscópio estereoscópio Leica MZ12₅ (Figura 2).

Os ovócitos eqüinos foram mantidos em fluido folicular eqüino obtido de folículos de 25 a 30mm de diâmetro até o momento da seleção. Para seleção foram utilizados somente ovócitos com citoplasma esférico, não fragmentado e que apresentavam pelo menos uma camada de células da granulosa compacta ao redor (Figura 3).

Após a seleção, os ovócitos foram separados em seis grupos experimentais sendo que na primeira estação de monta (Agosto a Dezembro de 2002) foi realizado o experimento I com três grupos experimentais e na segunda estação de monta (Junho a Outubro de 2003) o experimento II que compreendeu os outros três grupos experimentais e a transferência cirúrgica dos ovócitos maturados *in vitro* para o oviduto de receptoras não cíclicas.

EXPERIMENTO I

Foram realizados 5 procedimentos de Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos, com uma média de 30,4 ovócitos por grupo. Para a Maturação *in vitro* os ovócitos foram cultivados em placas com 4 poços (Nunc®, Dinamarca), contendo 400µl de meio de maturação em cada poço e 25 a 30 ovócitos por poço. Os ovócitos foram lavados por 5 vezes no meio de maturação correspondente ao grupo experimental e maturados à 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar por 36-40 horas.

Grupos Experimentais:

Grupo TCM 199 - os ovócitos foram maturados em meio TCM-199 acrescido de 1mM L-glutamina, 0,32mM piruvato de sódio, 3,3 mM lactato de sódio, 0,4mM cisteína, 0,1mM taurina, 0,4mM glicina, 8mg/ml BSA, 10ng/ml IGF-1 (Sigma, St. Louis, I-1271), 50ng/ml EGF (Sigma, St. Louis, E-4269), 5µg/ml bFSH (Foltropin-V®, Vetepharma, Canadá) e 500ng/ml E₂ (Sigma, St. Louis, E0130).

Grupo SOFaa – os ovócitos foram maturados em meio SOFaa, acrescido de 1mM L-glutamina, 0,32mM piruvato de sódio, 3,3 mM lactato de sódio, 0,4mM cisteína, 0,1mM taurina, 0,4mM glicina, 8mg/ml BSA, 10ng/ml IGF-1 (Sigma, St. Louis, I-1271), 50ng/ml EGF (Sigma, St. Louis, E-4269), 5µg/ml bFSH (Foltropin-V®, Vetepharma, Canadá) e 500ng/ml E₂ (Sigma, St. Louis, E0130).

Grupo HTF:BME – os ovócitos foram maturados em meio HTF:BME (1:1), acrescido de 1mM L-glutamina, 0,32mM piruvato de sódio, 3,3 mM lactato de sódio, 0,4mM cisteína, 0,1mM taurina, 0,4mM glicina, 8mg/ml BSA, 10ng/ml IGF-1 (Sigma,

St. Louis, I-1271), 50ng/ml EGF (Sigma, St. Louis, E-4269), 5µg/ml bFSH (Foltropin-V[®], Vetepharma, Canadá) e 500ng/ml E₂ (Sigma, St. Louis, E0130).

Avaliação da Maturação Nuclear

A maturação nuclear foi examinada após o final do período de maturação. As células da granulosa dos complexos *cumulus* ovócitos eqüino foram retiradas em meio Hepes-TCM 199 acrescido de 300UI/ml de hialuronidase (tipo V) com auxílio de uma pipeta de vidro de ponta fina. Os ovócitos totalmente desnudos foram incubados em 10µl de PBS e 10µl de Hoechst 33342 em lâmina histológica coberta com lamínula e examinados em microscópio invertido Leica DMIRB equipado com luz fluorescente ultra-violeta (filtro 350 e 461nm) (Figura 4 A e B).

Avaliação da Maturação Citoplasmática

A avaliação ultra-estrutural foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do IB – UNESP, Botucatu-SP. A morfologia dos ovócitos foi analisada utilizando-se a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Foram utilizados neste experimento 5 ovócitos colhidos aleatoriamente após o período completo de Maturação *in vitro* de cada grupo testado, bem como previamente ao início do período de maturação. Os ovócitos foram fixados em glutaraldeído à 2,5% em tampão fosfato à 0,1M (pH 7,4) e após fixação em tetróxido de ósmio à 1% em mesmo tampão. Após a desidratação em séries crescentes de acetona, os ovócitos foram incluídos em Epon. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram então examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301. Foi realizada uma análise descritiva dos resultados obtidos na morfologia citoplasmática.

Análise Estatística

As diferenças estatísticas para cada um dos tratamentos em relação as médias de maturação nuclear foram determinadas utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA).

EXPERIMENTO II

Tendo em vista os resultados numéricos de maturação nuclear e os efeitos benéficos obtidos na morfologia citoplasmática com a utilização do meio HTF:BME no experimento I, foram realizados mais cinco procedimentos experimentais de maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos, com uma média de 34,1 ovócitos por grupo. Para a Maturação *in vitro* foram cultivados em placas com 4 poços (Nunc®, Dinamarca), contendo 400µl de meio de maturação em cada poço e 25 a 30 ovócitos por poço. Os ovócitos foram lavados por 5 vezes no meio de maturação correspondente ao grupo experimental e maturados à 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar por 36-40 horas.

Grupos Experimentais

Grupo FSH bov - os ovócitos foram maturados em meio HTF:BME (1:1), acrescido de 1mM L-glutamina, 0,32mM piruvato de sódio, 3,3 mM lactato de sódio, 0,4mM cisteína, 0,1mM taurina, 0,4mM glicina, 8mg/ml, BSA, 50ng/ml EGF (Sigma, St. Louis, E-4269), 500ng/ml E₂ (Sigma, St. Louis, E0130) e 5µg/ml bFSH (Foltropin-V®, Vetepharm, Canadá).

Grupo FSH eq - os ovócitos foram maturados em meio HTF:BME (1:1), acrescido de 1mM L-glutamina, 0,32mM piruvato de sódio, 3,3 mM lactato de sódio, 0,4mM cisteína, 0,1mM taurina, 0,4mM glicina, 8mg/ml BSA, 50ng/ml EGF (Sigma, St. Louis, E-4269), 500ng/ml E₂ (Sigma, St. Louis, E0130), 5µg/ml FSHe (Bioniche, USA).

Grupo FSH eq + eGH (Equine Growth Hormone) - os ovócitos foram maturados em meio HTF:BME (1:1), acrescido de 1mM L-glutamina, 0,32mM

piruvato de sódio, 3,3 mM lactato de sódio, 0,4mM cisteína, 0,1mM taurina, 0,4mM glicina, 8mg/ml BSA, 50ng/ml EGF (Sigma, St. Louis, E-4269), 500ng/ml E₂ (Sigma, St. Louis, E0130), 5 µg/ml eFSH + 100 ng/ml eGH (EquiGen_{TM}, BresaGen, USA).

Avaliação da Maturação Nuclear

A maturação nuclear foi examinada após o final do período de maturação. As células da granulosa dos complexos *cumulus* ovócitos eqüino foram retiradas em meio Hepes-TCM 199 acrescido de 300UI/ml de hialuronidase (tipo V) com auxílio de uma pipeta de vidro de ponta fina. Os ovócitos totalmente desnudos foram incubados em 10µl de PBS e 10µl de Hoechst 33342 em lâmina histológica coberta com lamínula e examinados em microscópio invertido Leica DMIRB equipado com luz fluorescente ultra-violeta (filtro 350 e 461nm).

Avaliação da Maturação Citoplasmática

A avaliação ultra-estrutural foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do IB – UNESP, Botucatu-SP. A morfologia dos ovócitos foi analisada utilizando-se a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Foram utilizados neste experimento 5 ovócitos colhidos aleatoriamente após o período completo de Maturação *in vitro* de cada meio testado, bem como previamente ao início do período de maturação. Os ovócitos foram fixados em glutaraldeído à 2,5% em tampão fosfato à 0,1M (pH 7,4) e após fixação em tetróxido de ósmio à 1% em mesmo tampão. Após a desidratação em séries crescentes de acetona, os ovócitos foram incluídos em Epon. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram então examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301. Foi realizada uma análise descritiva dos resultados obtidos na morfologia citoplasmática.

Tratamento Hormonal das Receptoras

Para transferência de ovócitos foram selecionadas éguas receptoras em anestro ou atividade ovariana transicional. Os animais foram tratados por três dias

consecutivos com doses decrescentes (5, 3 e 2ml/dia) de Cipionato de Estradiol (ECP), no terceiro dia de tratamento foi realizado o exame ultra-sonográfico do trato reprodutivo para constatação de edema uterino, caracterizado pela presença de dobras endometriais. Os animais que apresentavam edema uterino positivo foram submetidos à Transferência de Ovócitos.

Após a cirurgia foi iniciado o tratamento com 200mg/dia de Progesterona (Laboratório BET) até o momento do diagnóstico de gestação e contagem do número de vesículas embrionárias (aproximadamente 15 dias pós transferência).

Transferência dos Ovócitos

Foram transferidos uma média de 12,8 ovócitos por receptora (2 receptoras para cada grupo experimental de ovócitos), que foram inseminadas via intra-uterina, 12 horas antes e 12 horas após a transferência com 2×10^9 SPTZ com motilidade progressiva estendidos em 20 ml de meio à base de leite desnatado (meio K75 desenvolvido pela Área de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Botucatu-SP).

Para a transferência de ovócitos as receptoras foram sedadas (0,05 mg/kg de Acepromazina, 40 minutos antes do procedimento cirúrgico). A área do flanco foi lavada e preparada para cirurgia com aplicações de iodo povidine degermante e alcóolico. No bloqueio anestésico local foram utilizados 100ml de Lidocaína 2%. Sedação adicional com 40µg/Kg de Romifidina foi realizada logo antes da cirurgia. O ovário e o oviduto foram exteriorizados pela incisão de pele no flanco (linha média entre a última costela e a tuberosidade coxal). Os ovócitos em <0,2ml de meio de transferência (meio de MIV) foram transferidos usando uma pipeta de vidro de ponta fina, avançando pelo infundíbulo para dentro do oviduto 2 a 3 cm (Figura 5).

As receptoras receberam 2 gramas de fenilbutazona por 3 dias, antibiótico (Penicilina Procaína G, 20 000 IU/Kg) administrado logo antes e após a cirurgia por 5 dias e curativo local até a retirada dos pontos com 7 dias após a TO.

Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação e contagem do número de vesículas embrionárias foram realizados pelo exame ultra-sonográfico no dia 15 após a transferência .

A manutenção das gestações foi realizada com a administração diária de 200mg/dia de Progesterona (Laboratório BET) até os 90 dias após a transferência.

Análise Estatística

As diferenças estatísticas para cada um dos tratamentos em relação as médias de maturação nuclear foram determinadas utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA).

RESULTADOS

A média de ovócitos recuperados foi de 2,28 ovócitos/ovário, sendo que no total foram obtidos 1140 ovócitos para a realização do trabalho. Os valores individuais por procedimento de maturação variaram quanto a taxa de recuperação, número de descartes e número de perdas na manipulação. Tais variações estão expressas na Tabela 1 para o experimento I e na Tabela 2 para o experimento II.

Tabela 1- Números de ovócitos obtidos de ovários de abatedouro no experimento I: recuperados, descartados, colocados para MIV, separados para a avaliação em MET (imaturos e maturados), perdidos durante a manipulação e avaliados em microscopia de fluorescência, nos cinco procedimentos experimentais, no período de Agosto a dezembro de 2002

Data	Ovócitos					
	Recuperados (X/ovário)	Descartes	MIV	MET	Perdas	Avaliados
07/08/02	93 (1,86)	12	81	15	06	60
09/10/02	152 (3,04)	17	135	15	23	97
21/10/02	101 (2,02)	05	96	15	17	64
19/11/02	76 (1,52)	13	63	15	05	43
11/12/02	131 (2,62)	10	121	15	05	101
Total	553 (2,21)	57	496	75	56	365

A média de ovócitos obtidos no experimento I foi de 2,21 por ovário (50 ovários/procedimento) sendo que 11,4 em média foram descartados por procedimento quanto ao aspecto das células do *cumulus* e as características citoplasmáticas. Foram colocados para maturar em média 99,2 ovócitos por procedimento ou seja, 33,06 por grupo experimental; foram perdidos em média 11,2 ovócitos por procedimento durante a manipulação e foram checados quanto a maturação nuclear em microscopia de fluorescência, em média 24,33 por grupo experimental.

Tabela 2- Números de ovócitos obtidos de ovário de abatedouro no experimento II: recuperados, descartados, colocados para MIV, separados para a avaliação em MET, transferidos, perdidos durante a transferência, perdidos durante a manipulação e que foram avaliados em microscopia de fluorescência, nos cinco procedimentos experimentais, no período de Junho a Outubro de 2003

Data	Ovócitos					Perdas TO	Perdas	Avaliados
	Recuperados (X/ovário)	Descartes	MIV	MET	TO			
01/06/03	134 (2,68)	20	114	15	-	-	42	57
12/09/03	166 (3,32)	25	141	15	-	-	33	93
08/10/03	94 (1,88)	06	88	15	30	-	03	40
21/10/03	114 (2,28)	14	100	15	10	10	05	60
29/10/03	79 (1,58)	11	68	-	37	-	08	23
Total	587 (2,35)	76	511	60	77	10	91	273

A média de ovócitos obtidos no experimento II foi de 2,35 por ovário (50 ovários/procedimento) sendo que 15,2 em média foram descartados por procedimento quanto ao aspecto das células do *cumulus* e as características citoplasmáticas. Foram colocados para maturar em média 102,2 ovócitos por procedimento ou seja, 34,1 por grupo experimental; foram perdidos em média 18,2 ovócitos por procedimento durante a manipulação e foram checados quanto a maturação nuclear em microscopia de fluorescência, em média 18,2 ovócitos por grupo experimental.

EXPERIMENTO I

Em cada repetição do experimento I utilizou-se uma média de 30,4 ovócitos por grupo, para a avaliação do estágio de maturação nuclear em microscopia de fluorescência e 5 ovócitos por grupo para observação da maturação citoplasmática em microscopia eletrônica de transmissão.

Na análise dos grupos para as taxas de ovócitos que atingiram metáfase II, observou-se que não houve diferença estatística para a média de ovócitos

maturados em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199 (29,2%; 23,8% e 13,8%, respectivamente) (Tabela 4, Figura 6).

Tabela 3– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II para ovócitos maturados *in vitro* no experimento I

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	305,3	2,88	0,095
Resíduo	12	106,0		
Total	14			

Tabela 4– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002

Grupo	
HTF:BME	29,2 ± 9,6
SOF	23,8 ± 8,4
TCM	13,8 ± 12,4
p=0,095	

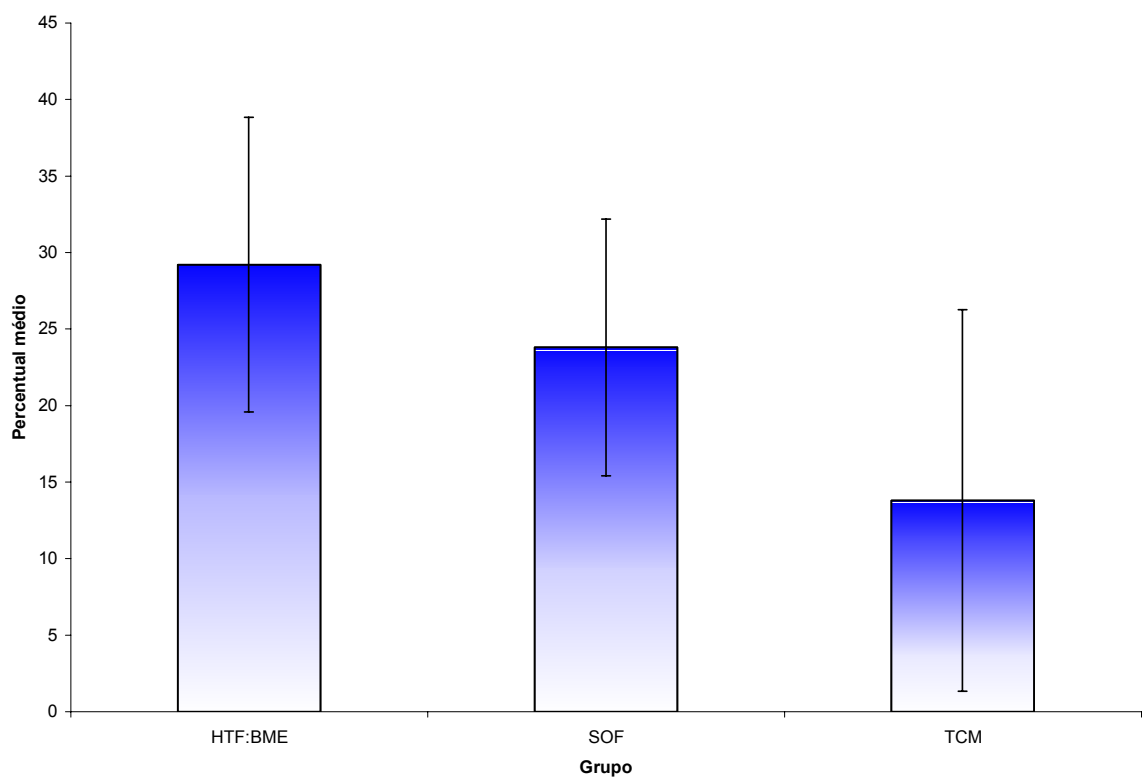


Figura 6— Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 (p=0,095)

Na análise dos grupos para as taxas de ovócitos que degeneraram durante o processo de maturação ovocitária, observou-se que não houve diferença estatística para a média de ovócitos maturados em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199 (32,6%; 32,8% e 43,4%, respectivamente) (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 5– Análise de variância referente à porcentagem de degenerados para ovócitos maturados *in vitro* no experimento I

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	190,9	1,14	0,351
Resíduo	12	167,1		
Total	14			

Tabela 6– Média e desvio padrão referente à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002

Grupo	
HTF:BME	32,6±13,9
SOF	32,8±10,1
TCM	43,4±14,4
p=0,351	

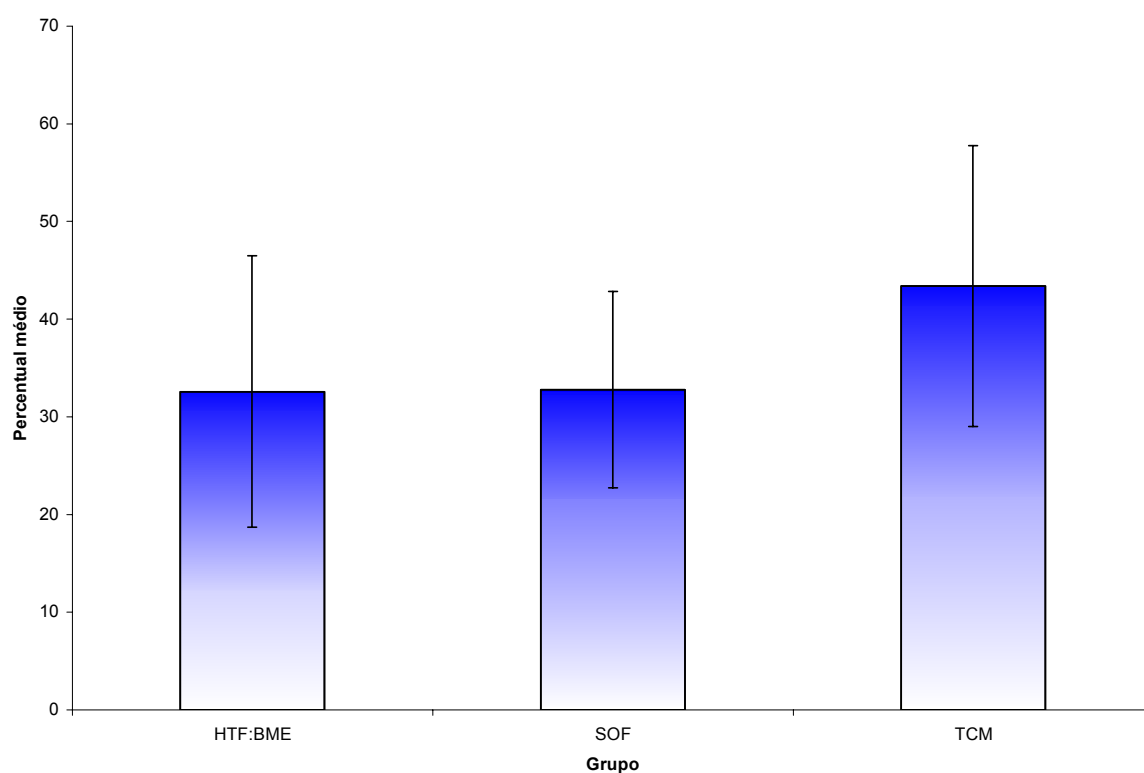


Figura 7– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 (p=0,351)

Na análise dos grupos para as taxas de ovócitos em metáfase II viáveis, isto é, os quais foram subtraídos do total os ovócitos que degeneraram durante o processo de maturação ovocitária, para a realização da média. Observou-se que não houve diferença estatística para os diferentes grupos de maturação HTF:BME, SOFaa e TCM 199 (45,4%; 36,8% e 22%, respectivamente) (Tabela 8 e Figura 8). Igualmente sem diferença estatística foi à análise dos grupos quando foram somadas as taxas de metáfase I + metáfase II, para evidenciar se os meios de maturação foram competentes em reiniciar a meiose (54%; 52,8% e 40% respectivamente para os meios HTF:BME; SOFaa e TCM 199) (Tabela 10 e Figura 9).

Tabela 7– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II viáveis para ovócitos maturados *in vitro* no experimento I

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	700,5	2,39	0,134
Resíduo	12	293,3		
Total	14			

Tabela 8– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002

Grupo	
HTF:BME	45,4±17,1
SOF	36,8±15,8
TCM	22,0±18,4
p=0,134	

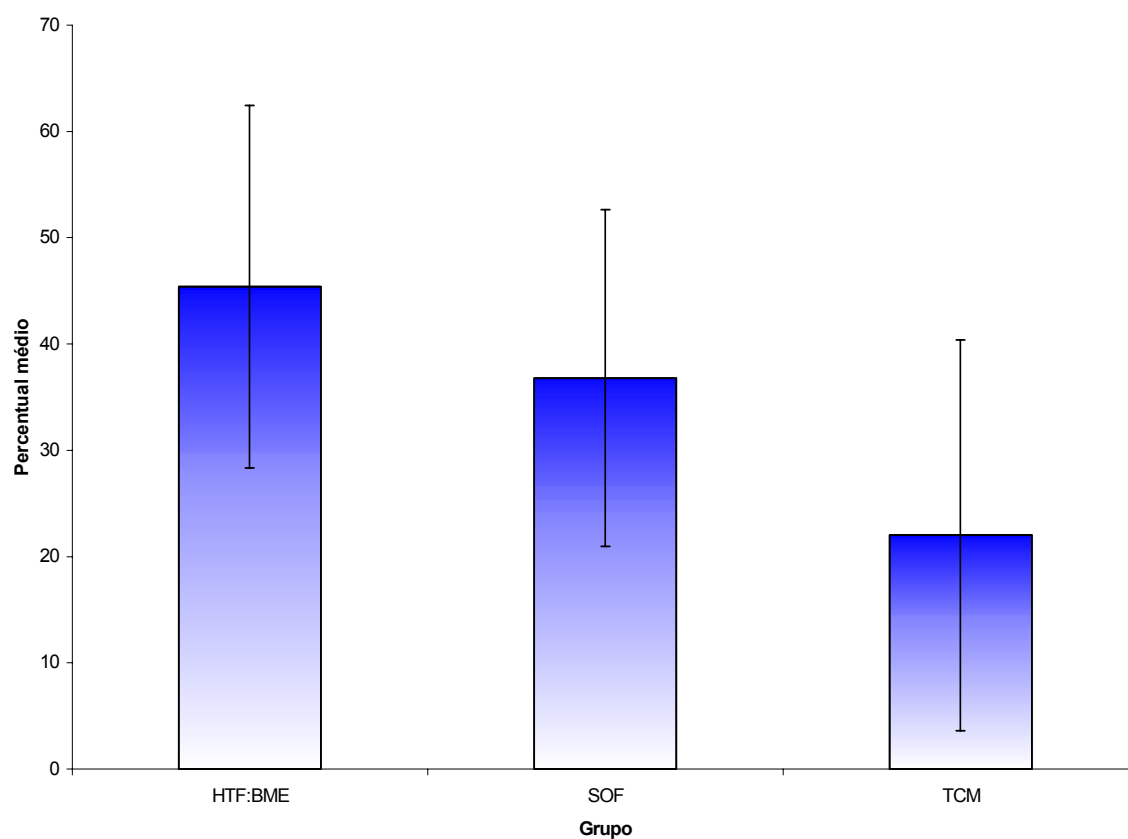


Figura 8– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 (p=0,134)

Tabela 9– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II para ovócitos maturados *in vitro* no experimento I

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	301,1	1,08	0,369
Resíduo	12	277,9		
Total	14			

Tabela 10– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002

Grupo	
HTF:BME	54,0±12,8
SOF	52,8±13,3
TCM	40,0±22,2
p=0,369	

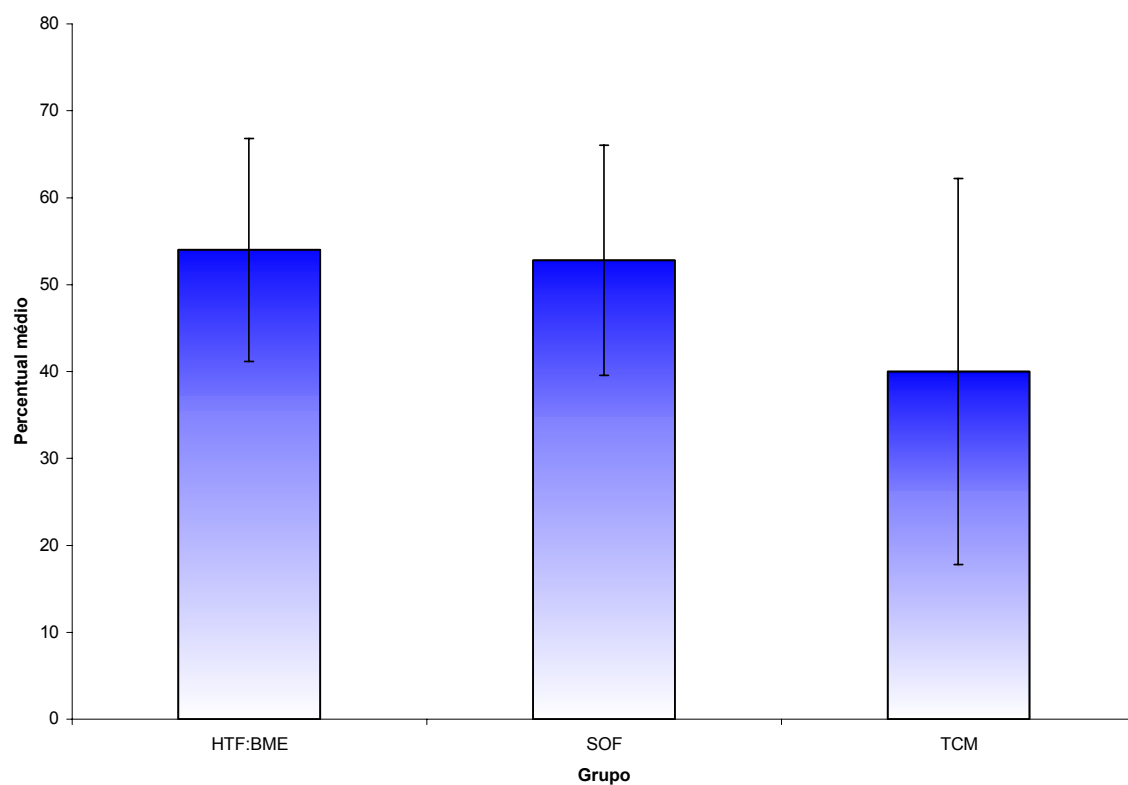


Figura 9— Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase I + metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME, SOFaa e TCM 199, no período de Agosto a Dezembro de 2002 ($p=0,369$)

EXPERIMENTO II

Em cada repetição do experimento II utilizou-se uma média de 34,1 ovócitos por grupo, para a avaliação do estágio de maturação nuclear em microscopia de fluorescência e 5 ovócitos por grupo para observação da maturação citoplasmática em microscopia eletrônica de transmissão.

Na análise dos grupos para as taxas de ovócitos que atingiram metáfase II, observou-se que não houve diferença estatística para a média de ovócitos maturados em meio suplementado com FSH bov, FSH eq e FSH eq + eGH (37,1%; 25,8% e 29,8%, respectivamente) (Tabela 12, Figura 10).

Tabela 11– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	144,1	0,65	0,545
Resíduo	10	223,5		
Total	12			

Tabela 12– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003

Grupo	
FSH bov	37,1±22,4
FSH eq	25,8±8,2
FSH eq + eGH	29,8±12,3
p=0,545	

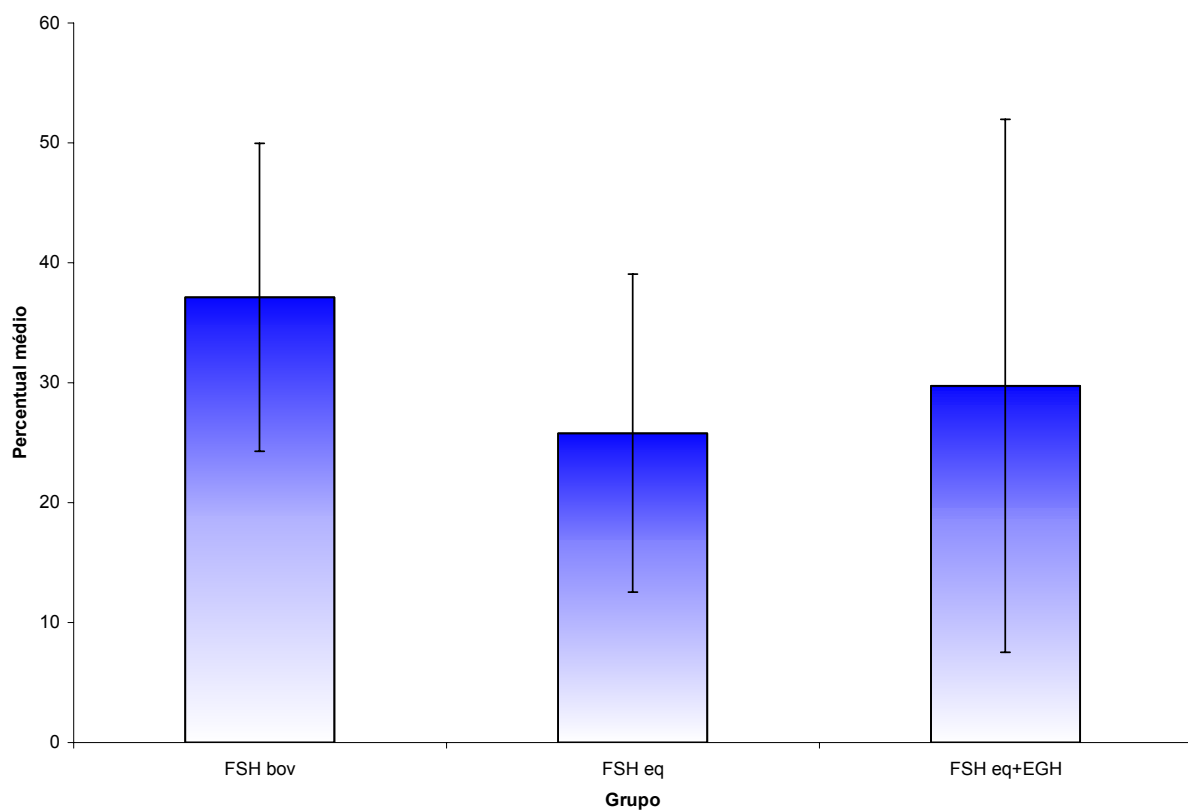


Figura 10– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003 (p=0,545)

Na análise dos grupos para as taxas de ovócitos que degeneraram durante o processo de maturação ovocitária, observou-se que não houve diferença estatística para a média de ovócitos maturados em meio suplementado com FSH bov; FSH eq e FSH eq + eGH (36,5%; 35,0% e 21,3%, respectivamente) (Tabela 14 e Figura 11).

Tabela 13– Análise de variância referente à porcentagem de degenerados para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	290,3	0,87	0,448
Resíduo	10	333,2		
Total	12			

Tabela 14– Média e desvio padrão referente à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003

Grupo	
FSH bov	36,5±28,6
FSH eq	35,0±7,9
FSH eq + eGH	21,3±14,4
p=0,448	

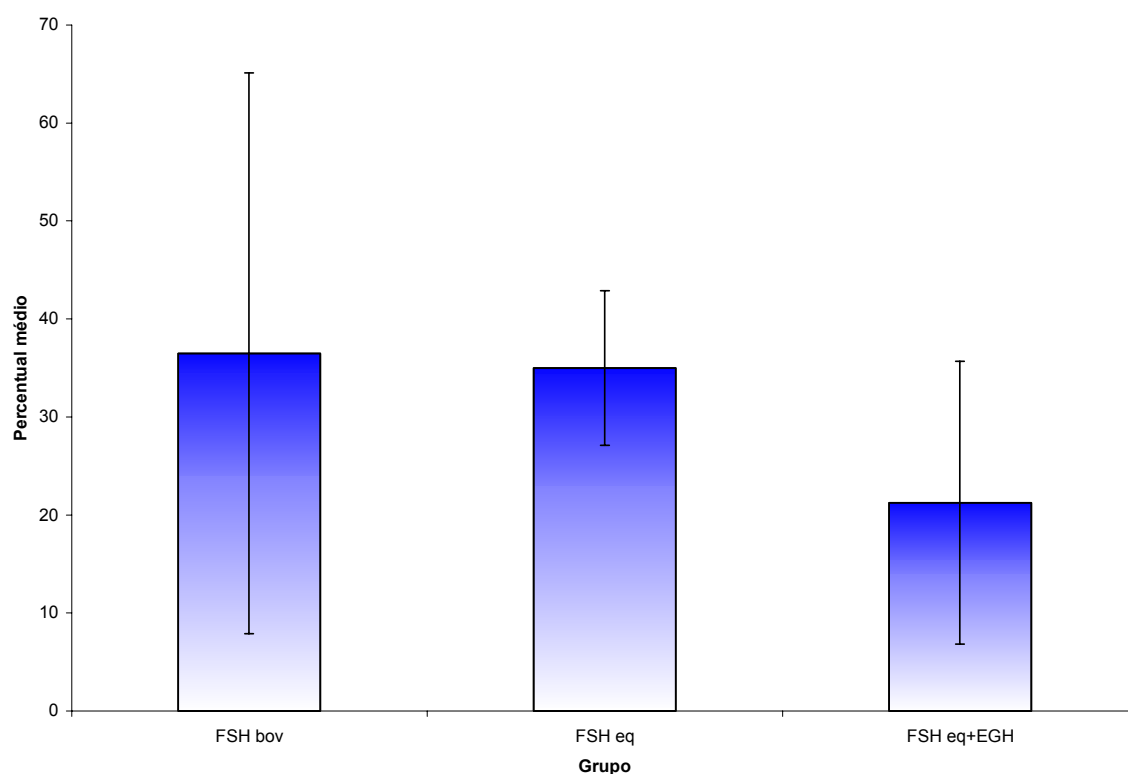


Figura 11– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de degenerados segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003
($p=0,448$)

Na análise dos grupos para as taxas de ovócitos em metáfase II viáveis, isto é, os quais foram subtraídos do total os ovócitos que degeneraram durante o processo de maturação ovocitária, para a realização da média, observou-se que não houve diferença estatística para os diferentes grupos de maturação FSH bov, FSH eq e FSH eq + eGH (54,6%; 40,1% e 39,0%, respectivamente) (Tabela 16 e Figura 12). Igualmente sem diferença estatística foi à análise dos grupos quando foram somadas as taxas de metáfase I + metáfase II para evidenciar se as fontes de gonadotrofinas foram eficientes em reiniciar a meiose (58,8%; 60,8% e 74,0% respectivamente para FSH bov, FSH eq e FSH eq + eGH) (Tabela 18 e Figura 13).

Tabela 15– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase II viáveis para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	313,5	1,04	0,390
Resíduo	10	302,7		
Total	12			

Tabela 16– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003

Grupo	
FSH bov	54,6±18,2
FSH eq	40,1±15,5
FSH eq + eGH	39,0±19,0
p=0,390	

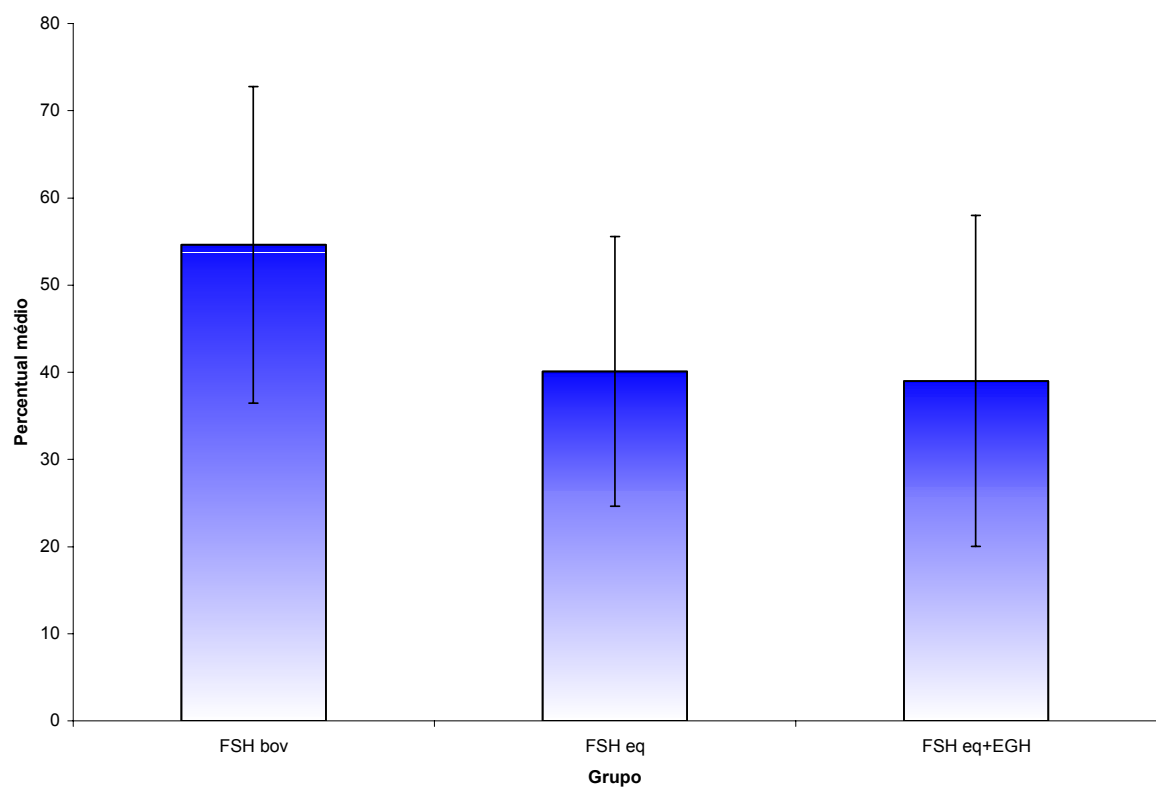


Figura 12– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003
($p=0,390$)

Tabela 17– Análise de variância referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II viáveis para ovócitos maturados *in vitro* no experimento II

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Grupo	2	280,4	0,70	0,518
Resíduo	10	399,2		
Total	12			

Tabela 18– Média e desvio padrão referente à porcentagem de metáfase I + metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003

Grupo	
FSH bov	58,8±29,5
FSH eq	60,8±9,7
FSH eq + eGH	74,0±18,3
p=0,518	

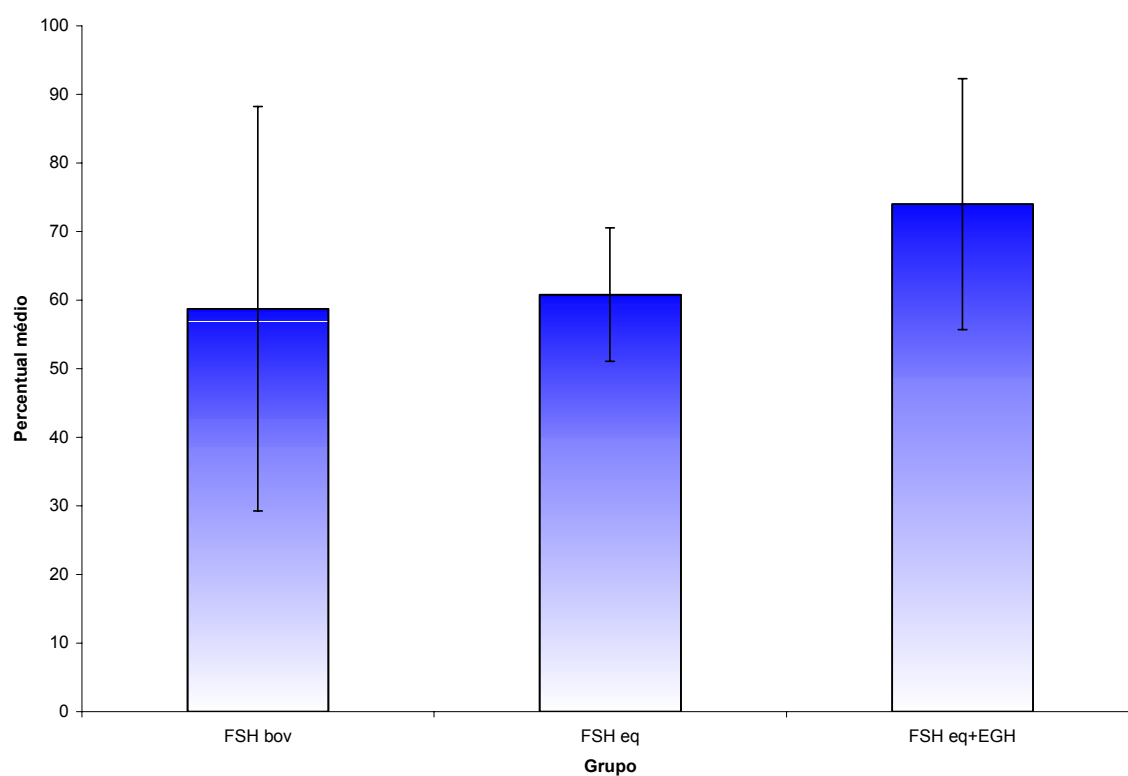


Figura 13– Média e desvio-padrão referentes à porcentagem de metáfase I + metáfase II viáveis segundo grupo, para ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em meio HTF:BME suplementado com FSH bov, FSH eq ou FSH eq + eGH, no período de Junho a Outubro de 2003
($p=0,518$)

TRANSFERÊNCIA DE OVÓCITOS

Como parte do experimento II foram realizados três procedimentos de Transferências de Ovócitos. Cada procedimento contou com uma a três éguas receptoras, sendo transferidos com sucesso uma média de 12,8 ovócitos para cada uma das seis éguas receptoras, sendo utilizadas duas éguas para cada grupo experimental

As cirurgias foram realizadas no mês de Outubro de 2003, os resultados foram observados 15 e 90 dias após as TOs e estão expressos na Tabela 19 e na Figura 14.

Tabela 19- Transferências de Ovócitos realizadas durante o mês de Outubro de 2003 com relação ao número de ovócitos transferidos, grupo experimental, diagnóstico de gestação (DG) aos 15º e 90º dias e porcentagem de vesículas embrionárias

Data	Égua	Ovócitos transferidos	Grupo	DG 15 dias	Nº de vesículas (%)	DG 90 dias
10/10/03	A	15	FSH eq	-		-
10/10/03	B	15	FSH eq + eGH	-		-
23/10/03	C	10	FSH bov	+	01 (10%)	+
31/10/03	A	08	FSH bov	-		-
				(liq. uterino)		
31/10/03	B	14	FSH eq	-		-
				(liq. uterino)		
31/10/03	D	15	FSH eq + eGH	+	01(6,7%)	+

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL

Ovócitos imaturos

A principal característica dos ovócitos imaturos examinados foi a grande quantidade de mitocôndrias e a presença no citoplasma de uma grande quantidade de grânulos de baixa elétrôn-densidade identificados como gotas de lipídeo (Figura 15). Estes grânulos com freqüência apareceram associados às mitocôndrias (Figura 15). Em alguns dos casos foram observados restos membranosos no interior de alguma das gotas ou grânulos (Figuras 16), as quais também se encontravam associadas as mitocôndrias (Figura 16).

As mitocôndrias apresentavam-se pequenas arredondadas ou em forma de alteres com poucas cristas internas e distribuídas por todo o ovoplasma (Figura 15), em grupos, associadas à gotas de lipídeos, aos complexos de Golgi e ao retículo endoplasmático liso. Algumas mitocôndrias apresentavam-se com formas irregulares, contendo concavidades (Figura 17).

O complexo de Golgi apresentou-se também na periferia do ovoplasma, bem desenvolvido e constituído por várias cisternas sobrepostas e associados a pequenas vesículas recobertas (Figura 17), semelhantes as observadas originando-se por pinocitose na superfície do ovócito (Figura 17). Nas proximidades do complexo de Golgi foram observados alguns grânulos limitados por membranas, com conteúdo elétrôn-densos, os quais foram caracterizados como grânulos corticais (Figura 18). Grânulos semelhantes foram observados próximo a membrana plasmática, embora em pequeno número (Figura 19A e 19B) e dispersos pelo citoplasma, ou agrupados em conjunto com as mitocôndrias (Figura 17). Retículo endoplasmático liso (REL) tubular apareceu principalmente na região sub-cortical do ovócito associados a mitocôndrias (Figura 17).

Nos ovócitos de eqüinos obtidos de folículos imaturos o núcleo apresentou-se localizado periféricamente e com formato esférico (Figura 20). Foi observada a presença de um nucléolo constituído por material fibrilar exibindo uma aparência de halo (Figura 20). O envelope nuclear dos ovócitos apresentou grande número de poros (Figura 20).

O espaço vitelínico dos ovócitos imaturos apresentou-se atravessado por microvilosidades (Figuras 17 e 19A). Através da zona pelúcida, constituída por material fibrilar, puderam ser observados os prolongamentos celulares originados das células da granulosa ainda presentes ao redor dos ovócitos (Figura 15). No interior do espaço perivitelínico estes prolongamentos fazem contato com a membrana vitelínica do ovócito ou com seus prolongamentos, sendo que em alguns pontos foi observada a presença de complexos juncionais entre eles (Figura 19A e 19B).

Os complexos juncionais em alguns casos parecem ser do tipo desmossomo, mas junções comunicantes e zônulas de oclusão parecem também estar presentes (Figura 19A e 19B), embora a posição dos cortes não permita visualizar bem entre que tipo de estruturas ou em que situações ocorram.

Ovócitos maturados in vitro

EXPERIMENTO I

Os ovócitos dos Grupos TCM199, SOFaa e HTF:BME apresentaram morfologia semelhante. Na análise ultra-estrutural observamos que em todos os grupos estudados os ovócitos apresentaram espaço perivitelínico preenchido por microvilosidades (Figura 21A e 21B). As organelas citoplasmáticas mais proeminentes foram as gotas de lipídeo e mitocôndrias, localizadas em pequenos agrupamentos (Figura 21A). As mitocôndrias foram observadas com freqüência em contato íntimo com o retículo endoplasmático (Figura 22). Grânulos corticais foram observados tanto na região central do ovoplasma como na periferia (Figura 23). Estes apresentaram tamanho e eletron-densidade variável (Figura 23). Na maioria dos ovócitos estudados dos grupos TCM199 e SOFaa, pôde-se observar que o espaço perivitelínico se encontrava preenchido por grande quantidade de restos celulares (Figura 24). Além disso, nestes ovócitos junções celulares entre as células da granulosa e o citoplasma dos ovócitos estavam presentes (Figura 25). A análise ultra-estrutural mostrou que após 36 horas de maturação in vitro o grupo de ovócitos cultivados em HTF:BME apresentaram uma menor quantidade de restos celulares no espaço perivitelínico, bem como uma distribuição dos grânulos corticais mais homogênea e alinhada com a membrana externa do ovócito (Figura 26).

EXPERIMENTO II

Em todos os grupos estudados foi observada uma grande quantidade de grânulos de lipídeo, distribuídos pelo citoplasma. No grupo onde foi utilizado o FSHe, estes apresentaram bordas irregulares e material membranoso em seu interior (Figura 27). A análise ultra-estrutural mostrou que uma maior quantidade de grânulos corticais localizada próximo ao oolema foi observada nos ovócitos maturados em HTF:BME em presença de FSHe (Figura 27). Nestes ovócitos observou-se um padrão homogêneo de distribuição de mitocôndrias com forma arredondada (Figura 27 e 28) e espaço perivitelínico estreito contendo microvilosidades. Embora se tenha observado a presença de grânulos corticais na periferia dos ovócitos maturados em presença de FSHb, estes apareceram em menor número (Figura 29). Quando o eGH foi adicionado ao meio de maturação, a morfologia dos ovócitos se apresentou semelhante aquela observada no grupo maturado com FSHb. Em nenhum dos ovócitos maturados no experimento II foi observada a extrusão de material celular contendo organelas ou a presença de junções celulares.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento da técnica de fertilização *in vitro* para a espécie equina. O nascimento do primeiro potro a partir de técnicas de produção *in vitro* ocorreu em 1990 (PALMER et al., 1990). Os ovócitos utilizados em pesquisas com PIV são normalmente provenientes de material de abatedouro, onde a origem, assim como o estágio do ciclo estral são desconhecidos. Além disso a disponibilidade de ovócitos maduros em metáfase II obtidos de folículos pré-ovulatórios é pequena, visto que não mais do que dois folículos pré-ovulatórios podem ser esperados no ciclo estral de uma égua (DESJARDINS et al., 1985; OKOLSKI et al., 1991; WILLIS et al., 1991; ALM & TORNER, 1994).

Poucos dados relatam sucesso na maturação *in vitro* de ovócitos equinos, e a porcentagem de metáfase II obtidas têm sido baixas (DEL CAMPO et al., 1992; CHOI et al., 1993; ALM & TORNER, 1994; BRISKO et al., 1995; BRUCK et al., 1996). As razões para esta baixa porcentagem são ainda indefinidas. Diversos fatores têm sido estudados, que poderiam influenciar a qualidade morfológica e a viabilidade dos ovócitos obtidos. Estes fatores incluem o método de extração (OKOLSKI et al., 1987; HINRICHS, 1991; DEL CAMPO et al., 1992; CHOI et al., 1993; ALM & TORNER, 1994; MLODAWSKA et al., 1996), tamanho e qualidade folicular (HINRICHS, 1991; DEL CAMPO et al., 1992; BRUCK et al., 1996), idade (BRISKO et al., 1995), e fase do ciclo estral da égua (DEL CAMPO et al., 1992; BRUCK et al., 1996).

Um fator que requer atenção adicional é o método de extração e a taxa de recuperação de ovócitos por ovário. Neste trabalho de dissertação foi utilizada a técnica de fatiamento do ovário descrita por Choi et al. (1993) para a recuperação de ovócitos equinos imaturos. Através deste procedimento foram obtidas taxas de recuperação de 2,28 ovócitos por ovário, o que corrobora com os achados de Landim-Alvarenga et al. (2002), que obtiveram uma taxa de recuperação de 2,03 ovócitos/ovário. Resultados superiores foram obtidos por Erice et al. (1995) utilizando a técnica de fatiamento, obtiveram taxas de 5,58 ovócitos por ovário, inferiores aos 8,28 ovócitos/ovário obtidos por Choi et al. (1993). Neste trabalho Choi et al. (1993) associaram a técnica de fatiamento à curetagem individual de cada

folículo. Trata-se de um método trabalhoso que consome muito tempo, e o período dispensado entre colheita e cultivo é um fator muito importante para a maturação e conseqüente fertilização dos ovócitos eqüinos.

Outros métodos de colheita de ovócitos têm sido utilizados na obtenção de CCOs imaturos. A aspiração folicular geralmente causa grandes danos ao complexo *cumulus*-ovócito (OKOLSKI et al., 1987; HINRICHS, 1991). Uma alta proporção de CCOs intactos é obtida com dissecação e ruptura dos folículos (OKOLSKI et al., 1987; DEL CAMPO et al., 1990), ou por incisão do folículo *in situ* e curetagem da camada de células da parede folicular (HINRICHS & DIGIORGIO, 1991; HINRICHS et al., 1993). Este método de colheita, embora com maior tempo consumido, aparenta ser superior ao de aspiração devido a maior produção de CCOS intactos. A morfologia ovariana da égua resulta em uma baixa taxa de ovócitos coletados por aspiração externa, visto que o parênquima ovariano que contém os folículos encontra-se com uma localização medular. Assim, muitos folículos não são visíveis na superfície ovariana (ERICE et al., 1997). Além disso a relação anatômica entre o ovócito e a parede folicular, no eqüino interfere com a eficiência dos métodos de colheita. Na égua o folículo apresenta uma camada de células da teca logo abaixo da junção do *cumulus* à parede folicular. Esta estrutura é caracterizada por processos celulares emitidos pelas células da granulosa para o interior da camada de células tecais. Desta forma, os processos das células da granulosa, bem como a posição da camada de células tecais e a estrutura do componente polissacarídeo desta funcionam como uma âncora para o ovócito na parede folicular (HAWLEY et al., 1995).

A técnica de recuperação de ovócitos utilizada influencia o tempo requerido para o processamento, o número e a qualidade dos ovócitos coletados. Apesar de Del Campo et al. (1992), afirmarem que a maturação de ovócitos eqüinos não é afetada pela quantidade de células do *cumulus* presente. Neste trabalho procurou-se selecionar ovócitos que apresentavam o *cumulus oophorus* completo uma vez que para Yang et al. (1990), este fator de seleção poderia afetar a habilidade dos ovócitos se desenvolverem após fecundação.

Quanto ao tamanho folicular, o protocolo estabelecido neste trabalho foi o de não utilizar ovócitos provenientes de folículos pré-ovulatórios uma vez que poderiam apresentar estágio avançado de maturação e conseqüentemente degenerar durante

o cultivo *in vitro*. Os níveis de maturação do ovócitos suínos (TSAFIRI & CHANNING, 1975) e bovinos (LONERGAN et al., 1992) são afetados pelo diâmetro do folículo escolhido para a aspiração. Del Campo et al. (1995) e Hinrichs (1991), observaram que altas taxas de ovócitos degenerados foram obtidos de folículos 5 a 10 mm (44%), quando os maiores folículos por par de ovários tinham tamanho < ou igual 10mm (63%) e quando foram recuperados de éguas prenhes (66%). A porcentagem de folículos atrésicos têm sido maiores para 10 mm (79%) do que folículos de 10 a 19 mm (58%) e acima de 20 mm (17%). Em resumo, ovócitos provenientes de folículos individuais < ou iguais a 10 mm ou em que o maior folículo é < ou igual a 10 mm são inadequados para MIV. Este tipo de avaliação não foi realizada neste trabalho, visto que quando se promoveu o fatiamento, uma população heterogênea de ovócitos de diferentes características, competência e tamanhos foliculares foram obtidos.

Brück et al. (1996) obtiveram taxas de MIV superiores para ovócitos provenientes de folículos maiores de 10mm, corroborando com os achados de Del Campo et al. (1995), isto porque avaliações histopatológicas demonstram que a viabilidade folicular aumenta com o tamanho do folículo e que folículos menores que 10mm são em geral 75% atrésicos (HINRICHS, 1991).

Okolski et al. (1991) maturando ovócitos com sinais de atresia primária (poucos núcleos picnóticos) ou secundária (muitos núcleos picnóticos) provenientes de folículos com níveis anormais de hormônios, obtiveram taxas de maturação (53%) semelhantes as obtidas de ovócitos saudáveis provenientes de folículos saudáveis.

Em eqüinos a maneira mais fácil de se obter um grande número de ovócitos em um curto período de tempo, para realização de experimentos, é através da utilização de ovários de abatedouro. A limitação deste material é normalmente dada pelo tempo variável que o ovócito é submetido, primeiramente o intervalo entre colheita do ovário após o abate e transporte deste até o laboratório e o segundo intervalo entre a retirada do ovócito do ambiente folicular até ser colocado nas condições de cultivo.

O intervalo entre a colheita dos ovócitos e o início do cultivo *in vitro* tem sido discutido por muitos autores. Shabpareh et al. (1993) determinaram que não há diferença entre a expansão das células do *cumulus* e as taxas de maturação de ovócitos coletados 5-6, 6-7, 7-8 horas após o abate. Similarmente, Del Campo et al.

(1995) demonstraram que o intervalo entre a colheita do ovário e o início do cultivo não altera as taxas de maturação. Ovócitos incubados por 3 a 9 horas ou 10 a 15 horas após o abate e maturados 24 a 48 horas atingem taxas de maturação de 49%. Contrariamente a estes dois estudos, Hochi et al. (1993) relataram baixas taxas de maturação com o aumento do tempo de estocagem dos ovários em solução salina à 30°C. Ovários estocados por 3 horas atingiram taxas de maturação ovocitária de 62,3% e quando estocados por 6 e 9 horas, as taxas de maturação foram respectivamente de 45% e 30,4%. Franz et al. (2002) também obtiveram taxas de maturação alteradas pelo intervalo entre colheita e cultivo, de forma que as taxas MII de 59 a 68% para ovócitos colocados em meio de maturação 1 hora após a colheita passaram há 20 a 45% com 5-9 horas tanto em temperatura de 15-18°C e 27-29°C, respectivamente. Neste trabalho o tempo entre a colheita e o início do cultivo foi de 10 a 12 horas, e foi observado que as taxas de ovócitos que degeneraram durante o cultivo foram superiores às encontradas em outros trabalhos, indicando que o alto tempo de transporte pode elevar as taxas de ovócitos degenerados. Com a suplementação protéica com BSA quando avaliamos as taxas de Metáfase II viáveis, isto é, as taxas de ovócitos totais subtraindo-se as taxas de degenerados para os experimentos I e II, percebemos que desta forma as taxas de maturação assemelham-se as apresentadas pela literatura. No experimento I foram obtidos: 45,4% para o HTF:BME, 36,8% para SOFaa e 22% para TCM 199 ($p=0,134$) (Tabela 8). No experimento II foram obtidos 54,6%, 40,1% e 39% para os grupos FSH bov, FSH eq e FSH eq+eGH, respectivamente ($p=0,390$) (Tabela 16) para MII viáveis.

Love et al. (2003) estudaram o efeito da estocagem em diferentes temperaturas e tempos de ovários eqüinos obtidos de abatedouro sobre as taxas de MIV. Uma maior taxa ($P<0,05$) de CCOs compactos foi obtida do grupo de estocagem 15-18 horas à 22-25°C, podendo ser devido ao afrouxamento entre as células do *cumulus* da parede folicular, no número de ovócitos degenerados no grupo de estocagem 15-18 horas à 4°C foi superior em relação aos outros grupos de estudo. Quanto a taxa de maturação o grupo controle no qual os ovócitos foram maturados imediatamente a chegada no laboratório (57%) foi significativamente maior aos grupos estocados ($P<0,001$), e entre os grupos estocados a taxa de MIV foi maior ($P<0,05$) para o mantido à 22-25°C (14%) em relação ao grupo mantido à 4°C (6%). Os resultados obtidos no experimento I para a taxa de MII, se aproximam

aos de Love et al. (2003), quando os ovários foram mantidos em 22 a 25°C por 15 a 18 horas (29,2; 23,8% e 13,8% para HTF:BME; SOFaa e TCM 199, respectivamente $p=0,95$) (Tabela 4)

Os CCOs encontrados neste trabalho foram mantidos em fluido folicular obtido de folículos menores de 25 a 30 mm até o momento da seleção, visto que se correlacionarmos com a espécie bovina, o efeito inibitório do fluido folicular sobre o reinício da meiose depende do estágio de desenvolvimento do folículo no momento da colheita do fluido (AKUFO et al., 1988), estando altamente relacionado ao pico de LH, sendo que ovócitos mantidos em meio de cultivo contendo fluido folicular obtidos antes ou até 4 horas após a administração exógena de Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) inibe o reinício da meiose, sendo que o contrario é verdade para ovócitos maturados em presença de fluido folicular colhido acima de 8 horas após a indução com GnRH (ROMERO-ARREDONDO & SEIDEL, 1996).

De fato a análise ultra-estrutural dos ovócitos fixados logo após a colheita demonstrou que estes ainda não apresentavam sinais de maturidade. Os ovócitos imaturos estudados apresentaram grande quantidade de grânulos de lipídeos distribuídos pelo citoplasma. Estas estruturas foram vistas em associação com mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, apresentando conteúdo amorfo de densidade eletrônica média. De acordo com Flemming & Saacke (1972) e Kruip et al. (1983) esta associação sugere a formação de unidades metabólicas. De fato a observação de algumas gotas sem o conteúdo amorfo e apresentando restos de membranas indica a metabolização do material neles contido, provavelmente colesterol. Não existem relatos de produção de esteróides por ovócitos de eqüinos, no entanto, é conhecida a capacidade do embrião de eqüino de produzir estrógeno em seus estágios iniciais do desenvolvimento (GINTHER, 1992). É possível que o RNAm para as enzimas que controlam a produção de hormônios esteróides já esteja presente no ovócito antes da fertilização.

Durante a fase de crescimento dos ovócitos de mamíferos, ocorre concomitantemente um aumento no número de mitocôndrias, bem como a modificação de sua morfologia. Em ovócitos primários de coelhas as mitocôndrias apresentam tamanho uniforme e formato elíptico ou alongado, com cristas típicas se projetando em direção ao lúmen da organela (HADEK, 1965). Em folículos de pré-ovulatório, próximo ao momento da ovulação, as mitocôndrias apresentam formato

arredondado e lúmen eletrôn-denso, com poucas cristas (HADEK, 1965). Neste estudo, não foram observadas diferenças com relação a morfologia das mitocôndrias dos ovócitos analisados, mas a associação destes com gotas lipídicas parece menos freqüente nos ovócitos maduros. As pequenas diferenças encontradas provavelmente estão relacionado ao fato de que os ovócitos imaturos estudados eram oriundos de folículos secundários e portanto já haviam superado a fase de crescimento celular.

Nos ovócitos fixados logo após a colheita o complexo de Golgi apresentou-se mais desenvolvido, constituído por inúmeras lamelas dilatadas associadas a vesículas membranosas de elétron-densidade variável, tanto na face cis como trans. As da face cis são vesículas recobertas e podem ser as vesículas picnóticas vistas na superfície do ovócito as quais estariam migrando em direção ao Golgi. Neste caso as vesículas da face trans poderiam conter o material absorvido já elaborado pelo Golgi. Como grânulos semelhantes aos grânulos corticais são observados na proximidade desta organela é possível que esta tenha um papel em sua produção. Estes achados estão de acordo com o observado por Hyttel et al. (1989) que observaram complexos de Golgi mais desenvolvidos em ovócitos bovinos imaturos, quando comparado com os já maturados. Dentre as vesículas membranosas encontradas na face trans, algumas apresentavam conteúdo elétron-denso e foram identificadas como grânulos corticais. Estas vesículas no ovócito imaturo apareceram em pequeno número, distribuídas pelo citoplasma e em associação com o complexo de Golgi.

No ovócito imaturo foi observado, no espaço perivitelínico, a presença de inúmeras junções celulares entre os prolongamentos das células da corona radiata que cruzam a zona pelúcida e as microvilosidades do ovócito. A conexão entre as células da granulosa e o ovócito tem sido observada por diferentes pesquisadores há várias décadas, estabelecendo-se a existência de uma íntima conexão e interação entre estes dois tipos celulares. Nos ovócitos imaturos estudados foi observado um espaço perivitelínico preenchido por microvilosidades, e regiões onde as células da granulosa se encontram aderidas a membrana do ovócito através de junções comunicantes. Estes achados estão de acordo com o observado por Hadek (1965) e por Hyttel et al. (1989). Evidências consideráveis tem demonstrado que as células foliculares intermediam a maturação ovocítica induzida por gonadotrofinas e

é possível que moléculas passem das células da granulosa para o ovócito pelas junções comunicantes (BROWDER, 1984).

A característica mais marcante observada nos ovócitos imaturos foi a presença da carioteca envolvendo um núcleo intacto contendo um nucléolo constituído por material fibrilar denso. O estágio de vesícula germinativa, com nucléolo vacuolizado não é característico de ovócitos de eqüinos. Nestes animais o nucléolo de ovócitos em fase de crescimento é constituído de dois componentes: uma porção interna fibrilar e densa e uma auréola fibrilar mais frouxa, oca também observada em bovinos por Flemming & Saacke (1972), Vogelsang et al. (1987) e Assey et al. (1994). Durante a fase de crescimento o nucléolo em bovinos e eqüinos é fibrino-granular e está ativamente sintetizando RNAr (CROZET et al., 1986). Já na fase final de crescimento exibe uma aparência de halo. Neste experimento além do nucléolo apresentar aspecto de halo, o núcleo se encontrava deslocado para periferia, o que indica um ovócito no final do período de crescimento.

Existe a possibilidade de neste trabalho terem sido colocados em meio de cultivo ovócitos provenientes de éguas velhas, devido a população heterogênea de ovários coletados no abatedouro. Resultados de diferentes estudos envolvendo um número diferentes de espécies indica que a qualidade dos ovócitos deterioram com a idade do animal, resultando no aumento da incidência de anormalidades ovocitárias e falhas no desenvolvimento (ADAMS, 1975).

Brisko et al. (1995) não observaram em seu experimento diferenças quanto ao número de folículos ou quanto ao número de ovócitos coletados entre os vários grupos de idade (ERICE et al., 1995), porém as taxas de MIV foram inferiores quando se trabalhou com ovócitos de éguas velhas. Além disso, foi observado que os ovócitos destes animais levavam um tempo de cultivo maior para atingir fases mais avançadas de maturação quando comparados com ovócitos de éguas jovens. Este atraso na maturação meiótica pode ser um dos responsáveis pela alta taxa de perda embrionária precoce nas éguas com mais de 15 anos de idade. Éguas idosas também podem apresentar uma maior proporção de ovócitos defeituosos, com anormalidades cromossômicas, levando a alta taxa de subfertilidade nestes animais não estando somente relacionada a problemas uterinos ou de oviduto (CARNEVALE & GINTHER, 1994).

Durante a manipulação dos ovócitos, após o cultivo de 36 horas em meio de maturação, foi realizada a retirada das células do *cumulus* para a avaliação do estágio de maturação nuclear. Durante o desnudamento foram obtidas altas taxas de perda de ovócitos por rompimento da ZP sendo uma média de 15% para os dois experimentos, o que corrobora com os achados de Brisko et al. (1995) que obtiveram resultados similares durante a manipulação.

Na égua, a atividade reprodutiva sazonal regulada pelo fotoperíodo, com conseqüente variação no desenvolvimento folicular pode influenciar o número de gametas femininos (PALMER et al., 1991). Minoia et al. (1993) estudaram a distribuição do tamanho folicular durante o ano e assim observaram uma alta prevalência de folículos de 5 a 29 mm durante a transição de primavera/verão e de folículos maiores de 30 mm durante a estação de monta. Assim, durante a transição de primavera/verão temos um aumento no número de CCOs. No entanto, os ovócitos deste período parecem ser mais sensíveis às condições hormonais do meio de cultivo. Neste trabalho numericamente não houve diferença entre as taxas de recuperação ovocitária nas épocas do ano utilizadas. Aparentemente no segundo experimento, quando se realizou um procedimento em final de outono e início de inverno (Junho) foi obtida uma alta taxa de ovócitos perdidos durante o desnudamento (32%), o que poderia estar relacionado com a alta taxa de ovócitos degenerados, e portanto frágeis, devido a irregularidade dos ciclos estrais que ocorrem neste período do ano.

Nos protocolos padrões de maturação *in vitro* caracteriza-se a adição de soro, estradiol, FSH, LH ou outros fatores com o objetivo de estimular o desenvolvimento *in vitro* (GUIXUE et al., 2001). Diversas publicações demonstraram que alguns fatores podem melhorar a competência ovocitária elevando significativamente o número de blastocistos produzidos. Fatores de crescimento, gonadotrofinas, soros específicos e diferentes condições de cultivo revelaram algum efeito nas taxas de produção e qualidade embrionária, mas nunca a ponto de todos os ovócitos responderem a estas condições (SIRARD et al., 1998). Por essa razão é evidente que as condições de cultivo têm um efeito significativo em permitir ao ovócito expressar seu potencial, mas os constituintes originais do ovócito controlam a sua habilidade de responder às melhores condições de cultivo (SIRARD, 2001).

As razões para a falha dos ovócitos eqüinos em completarem a meiose durante a maturação *in vitro* são desconhecidas. No entanto foi mostrado recentemente que a competência para a maturação *in vitro* aumenta com o aumento do diâmetro folicular e é baixa em folículos de 5-9mm, que são gonadotrofina independente (DRIANCOURT et al., 1983; GOUDET et al., 1997a; GOUDET et al., 1998c). Além disso, já foi mostrado que a competência ovocitária é influenciada pelo status reprodutivo da égua (GOUDET et al., 1997b). Isto nos permite assumir que existem alguns fatores locais, em relação ao crescimento folicular e maturação, cuja expressão varia durante o ciclo estral, e devem ter um papel crucial na aquisição de competência para maturação *in vitro*, entre eles: hormônios esteróides, receptores de LH, α -inibina, e aromatase são bons candidatos (GOUDET et al., 1999). Contudo, não foi observado nenhuma relação óbvia entre α -inibina, receptores de LH, e aromatase com o estágio de maturação nuclear do ovócito maturado *in vitro*. Além disso, os resultados de Goudet et al. (1999), demonstram haver uma relação entre o diâmetro folicular e estes fatores expressos nas células do *cumulus*, similar ao que ocorre entre o diâmetro folicular e a competência para o desenvolvimento *in vitro*. Também foi observado que a quantidade de aromatase, receptores de LH e α -inibina aumentam com o crescimento folicular, sendo que folículos de 5-9mm contêm baixas quantias destes fatores, bem como reduzidas taxas de maturação. Uma relação entre estes fatores e a competência ovocitária ainda não pode ser estabelecida, porém, a expressão destas duas proteínas assim como a competência para a maturação *in vitro*, é influenciada pelo diâmetro ovocitário, mostrando que pode haver uma relação entre a expressão destes três fatores e a competência do ovócito.

Apesar dos esforços consideráveis para o desenvolvimento de sistemas de cultivo que realmente induzam a completa maturação (nuclear e citoplasmática) *in vitro* de ovócitos eqüinos, um sistema ótimo ainda não foi desenvolvido. Atualmente os ovócitos eqüinos são maturados em meio TCM 199 acrescido de uma série de combinações de soros (ou componentes do soro), hormônios, macromoléculas e ou células somáticas (SQUIRES, 1996). Baseado somente nas taxas de maturação nuclear existe uma grande variação entre as taxas para a espécie eqüina (50 a 75%) que são tipicamente baixas quando comparadas as de outras espécies (SQUIRES, 1996).

Os meios de cultivo utilizados para a maturação dos ovócitos eqüinos são adaptados de meios utilizados no cultivo de bovino. Okolski et al. (1991) relataram uma alta mais não significativa taxa de maturação utilizando-se TCM 199 quando comparado com o meio Menezo B2 com 15% de soro fetal bovino e hormônios (26% versus 50%). TCM 199 e Ham F10 foram testados como meio de maturação por Shabpareh et al. (1992). Eles concluíram que ambos meios de cultivo produzem resultados similares, porém no Ham F10 os ovócitos levam um tempo maior para maturar (48 versus 36 horas). Willis et al. (1991) testaram o efeito dos meios TCM 199 e Menezo B2 suplementados com 15% de SFB, soro de égua no dia da ovulação e soro de égua no primeiro dia de cio. As melhores taxas de maturação e expansão das células do cumulus foram adquiridas com a utilização de TCM 199 adicionado de soro de égua no primeiro dia de cio (67%). Há uma grande variabilidade nas concentrações de hormônios e soros adicionados ao meio. De acordo com Zhang et al. (1989), taxas similares de maturação foram obtidas com a adição de 20% de soro de égua em estro ou 10% de SFB, mais gonadotrofinas.

Em eqüinos, Willis et al. (1994), trabalhando com ovócitos imaturos e maturados *in vitro* por 15 horas, descreveram que, enquanto o ovócito imaturo apresentava poucos grânulos corticais e poucas microvilosidades, após 15 horas de maturação os grânulos corticais apresentavam-se esféricos, com forma e tamanho homogêneo, densos e migravam até a membrana citoplasmática. Estes achados estão parcialmente de acordo com o observado neste trabalho. Nos ovócitos maturados *in vitro* utilizando-se TCM199 e SOFaa a maioria dos grânulos corticais apresentavam distribuição próximo a membrana vitelínica. Entretanto, estes apresentaram eletron-densidade e tamanho variável. Já nos ovócitos maturados em HTF: BME a distribuição dos grânulos corticais foi mais homogênea. Em particular o grupo que utilizou o FSH eqüino (FSHe) como fonte de gonadotrofina apresentou aspecto semelhante ao descrito na literatura para ovócitos maturados *in vivo*. Estes dados estão de acordo com o observado em ovócitos colhidos de folículos maiores que 35 mm após 24 a 36 horas da aplicação de hCG. Nestes os grânulos corticais apresentam conteúdo eletron-denso, tamanho homogêneo e se encontram dispostos logo abaixo da membrana vitelínica (LANDIM-ALVARENGA., 2002) Willis et al. (1991) também encontraram efeitos positivos na utilização de LH eqüino (LHe) em relação ao LH bovino (LHb). Bezard & Palmer (1992) demonstraram uma alta

porcentagem de maturação e expansão das células do *cumulus* com a utilização de fontes de gonadotrofinas eqüinas do que ovinas (51,2% versus 17,8%). No mesmo estudo, uma dose resposta de FSH e LH foi observada em adição do estradiol resultando em melhores taxas de maturação.

Nos ovócitos maturados em TCM199 e SOFaa junções celulares entre as células da granulosa e os ovócitos continuavam presentes. Este fato, associado a irregularidade de tamanho e distribuição dos grânulos corticais, indica que aparentemente os ovócitos destes grupos não sofreram completa maturação citoplasmática durante o período de cultivo. Já nos ovócitos maturados em presença de HTF:BME estas junções deixaram de ser observadas. De acordo com Odor (1960), no folículo pre-ovulatório de rato, os processos das células da granulosa começam a se retrair, e no momento da formação do 1º corpúsculo polar o espaço perivitelínico se encontra aumentado, não sendo mais observadas junções celulares entre as células somáticas e o ovócito. Neste experimento não foram observadas diferenças no que diz respeito a taxa de maturação nuclear entre os grupos. Apesar disso aparentemente a utilização do meio HTF:BME foi benéfica para a maturação citoplasmática dos ovócitos eqüinos.

Em mamíferos, a dissociação progressiva das células do cumulus do ovócito ocorre em resposta ao estímulo gonadotrófico durante o período pré-ovulatório (GILULA et al., 1978). Neste sentido a utilização de FSH de origem endógena seria benéfica por ocorrer uma ligação perfeita entre estas moléculas e seus receptores. De fato no grupo onde foi utilizado o FSH_h como fonte gonadotrófica, diversos sinais de maturação citoplasmática foram observados, tais como: a ausência de junções comunicantes entre o ovócito e as células do *cumulus*, o aumento na mobilização de lipídeos e a perfeita distribuição dos grânulos corticais. Entretanto, quando foi adicionado ao meio o eGH, os resultados foram aparentemente piores. Como este composto tem uma ação não totalmente elucidada no processo de maturação ovocitária, a sua presença, na concentração utilizada, pode não ter levado ao efeito benéfico desejado.

Nos grupos maturados em TCM199 e SOFaa foi observado o aumento do espaço perivitelínico com a presença de debris celulares em um grande número de ovócitos. Estes achados se assemelham a descrição morfológica do “cone de

fertilização” e “onda citoplasmática” que ocorre em ovócitos de diversas espécies no momento da fertilização (HADEK, 1963 e 1965). De acordo com Hadek (1963) a liberação dos grânulos corticais causa um aumento de fluidez da membrana vitelínica, a qual emite uma série de longos prolongamentos em direção ao espaço perivitelínico. Estes prolongamentos formariam a “onda citoplasmática”, a qual se movimentaria por sobre o espermatozoide aderido à membrana, recobrando-o (HADEK, 1963 e 1965). O aspecto ultra-estrutural desta “onda” se assemelha aos debris celulares observados no espaço perivitelínico dos ovócitos de eqüinos maturados em meio TCM199. Este fato foi observado anteriormente por Landim-Alvarenga (2002) em ovócitos maturados em TCM199 e sugere a ocorrência de uma reação cortical prematura.

Para que a fertilização ocorra com sucesso o ovócito deve estar maduro. Ovócitos expostos aos espermatozoides antes da maturação podem ser penetrados, no entanto, a falha na produção de fatores citoplasmáticos necessários a descondensação do material nuclear do macho resulta na não formação do pronúcleo masculino (MOOR et al., 1980). Se a maturação *in vitro* for utilizada, o ambiente de cultivo deve ser adequado para que ocorra a maturação tanto nuclear, como citoplasmática. Aparentemente a liberação precoce de 30 a 40% dos grânulos corticais ocorre naturalmente durante o processo de maturação *in vivo* (DULCIBELLA et al, 1988 e 1990). No entanto, as modificações resultantes da reação cortical prematura são controladas, *in vivo* através de mecanismos que envolvem a presença das células do cumulus que circundam o ovócito em maturação (DULCIBELLA et al, 1988 e 1990). Os mecanismos que controlam as relações entre células somáticas e gametas não são mimetizados com precisão nos sistemas de maturação *in vitro*. De acordo com Hendriksen et al. (2000) determinadas proteínas sintetizadas durante os últimos estágios da maturação *in vivo* não são observadas *in vitro*, além disso, a expansão das células do *cumulus* é muito mais intensa durante a maturação *in vivo*.

Em todos os grupos de ovócitos maturados *in vitro* estudados foram observadas alterações relacionadas a maturação citoplasmática incompleta. De acordo com Willis et al. (1991) que comparam a utilização de diversos tipos de soro e BSA em sistemas de maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos, mesmo em presença de gonadotrofinas os resultados de maturação nuclear com a utilização do BSA são

sempre inferiores. Desta forma nossos resultados podem estar relacionados a adição de BSA ao meio de maturação no lugar do SFB.

A suplementação protéica no meio de cultivo é benéfica ao desenvolvimento embrionário *in vitro* (CAROLAN et al., 1995). Soro Fetal Bovino (SFB) e Soro Albumina Bovina (BSA) são duas fontes de proteína comumente utilizadas nos meios de cultivo de embriões de mamíferos. Algumas formulações de meios de cultivo incorporam o BSA com fonte protéica para minimizar os efeitos negativos da adição de SFB (BAVISTER, 1995).

Embriões cultivados na ausência de proteínas exibem diferenças na atividade metabólica (ECKERT et al., 1998; KRISHER et al., 1998; LEE et al., 1998), diminuindo a capacidade de desenvolvimento (ECKERT et al., 1998; KRISHER et al., 1998) e possuindo um baixo número de células (PINYPUMMINTR & BAVISTER, 1991; LEE et al., 1998).

O papel da albumina durante o cultivo não é ainda claro. Há várias funções conhecidas para a albumina no meio de cultivo, como: quelante de metais pesados, agindo com tampão de pH, e também como fonte de aminoácidos do meio de cultivo (MEHTA & KIESSLING, 1990).

O uso de BSA como única fonte de proteína no meio de MIV de ovócitos bovinos, não só retarda a maturação nuclear como também diminui a capacidade de desenvolvimento de ovócitos, refletindo na produção de blastocistos *in vitro*. O efeito negativo do BSA pode ser funcional ou tóxico (ALI & SIRARD, 2002). Estes pesquisadores demonstraram que os ovócitos bovinos são sensíveis à suplementação protéica com BSA, e que esta suplementação retarda a QVG e a MII. Achados similares foram obtidos quando neste trabalho foi adicionado o BSA como fonte de proteína, na tentativa de melhor evidenciar os efeitos de diferentes meios de cultivo na maturação ovocitária. Os índices de maturação obtidos no Experimento I, foram inferiores aos apresentados pela literatura, 29,2% para HTF:BME; 23,8% para SOFaa e 13,8% para TCM 199 ($p=0,95$) (Tabela 4). Estas taxas representam a maturação de uma população heterogênea de ovócitos, como já foi descrito. Além disso, a suplementação com BSA pode ter interferido nas taxas de progressão meiótica.

Há um aumento significativo no percentual de ovócitos que atingem o estágio de metáfase II quando cultivados com SFB, SE ou SEO, do que quando comparados com o grupo de ovócitos cultivados em presença de BSA (WILLIS et al., 1991). Têm sido sugerido que o efeito embriotrófico do SFB deva ser devido a fatores de crescimentos presentes em sua composição (FLOOD et al., 1993).

Em um experimento realizado por Wang et al. (1997), no meio de maturação de ovócitos bovinos a adição de BSA não representou diferença estatística significativa em relação ao SFB. No entanto, o SFB promoveu melhores efeitos quando do cultivo pós-clivagem, sendo que a porcentagem de mórulas foi superior para o meio com BSA, enquanto no meio com SFB na mesma idade existiam maiores porcentagens de blastocistos, indicando que o SFB contém componentes que são benéficos ao desenvolvimento embrionário de mórula à blastocisto. Isto sugere que o BSA apresenta falta de propriedades embrio-estimulatórias, retardando o desenvolvimento embrionário. O mesmo pode ter ocorrido quando avaliou-se as taxas de ovócitos que reiniciaram a meiose e somando-se as taxas de metáfase I com as de metáfase II para o experimento I, obteve-se : 54% para HTF:BME, 52,8% para SOFaa e 40% para TCM 199 ($p=0,369$) (Tabela 10); e da mesma forma foi observado para o experimento II, onde obteve-se taxas de 58,8%, 60,8% e 74% para FSHbov, FSHeq e FSHeq+eGH, respectivamente ($p=0,518$) (Tabela 18), indicando que todos os meios de cultivo foram capazes de reiniciar a meiose, e que um atraso na progressão da meiose pode ter ocorrido pela presença do BSA

Os resultados de MII e degenerados obtidos nestes experimentos são corroborados com os obtidos por Landim-Alvarenga et al. (2002) que trabalhando com meio de maturação semelhante obtiveram taxas de MII de aproximadamente 18% e de degenerados de 36%, sendo que esta porcentagem de degenerados sobe para 53% sem a adição de fatores de crescimento no meio de cultivo ($P>0,05$).

O tempo de cultivo parece também ser motivo de controvérsia entre os autores, onde muitos estudos têm demonstrado altas taxas de maturação quando os ovócitos são cultivados por mais de 24 horas (FULKA & OKOLSKI, 1981; ZHANG et al., 1989; HINRICHS et al., 1993; SHABPAREH et al., 1992). Em contrapartida King (1990) relata que a maior parte dos ovócitos em seu estudo atingiram metáfase II com 24 horas de cultivo, já Willis et al. (1991) demonstraram que 15 horas são suficientes para a maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos. Os tempos de cultivo

devem ser avaliados com cuidado, visto que os ovócitos são coletados de folículos de abatedouro, transportados, selecionados, processados e aí sim colocados em cultivo, e o tempo utilizado nestas etapas pode influenciar o tempo de cultivo. O tempo de transporte no estudo de King (1990) foi de aproximadamente 2 horas e o de Willis et al. (1991) de 4 horas.

A maturação *in vivo* do ovócito eqüino é acompanhada de um aumento progressivo na concentração de LH mantido por muitos dias, a resposta *in vivo* da administração de hCG em uma égua com folículo > 35mm requer 30-48 horas para indução da ovulação, portanto pode-se especular que o ovócito eqüino necessite de um longo período para completar a maturação citoplasmática (CARNEIRO et al., 2001). Os índices de degenerados obtidos neste trabalho foram altos em relação aos descritos pela literatura. Isso pode ser explicado pelo alto tempo entre transporte e início do cultivo, e aliado a isso o tempo de maturação de 36 horas. As taxas de ovócitos degenerados no experimento I foram de 32,6% para o meio de cultivo HTF:BME, 32,8% para SOFaa e 43,4% para o TCM 199 ($p=0,351$) (Tabela 6); e para o experimento II foram de 36,5%, 35% e 21,3%, para os grupos FSHbov, FSHeq e FSHeq+eGH, respectivamente ($p=0,448$) (Tabela 14).

Hinrichs et al. (2003) testando diferentes tempos de transporte de ovários obtiveram melhores taxas de maturação de ovócitos provenientes de ovários transportados 45 minutos em relação a 4 a 8 horas, porém, os ovócitos do grupo com alto tempo de transporte atingiram MII mais rapidamente do que o grupo imediatamente cultivado, indicando que menor tempo de cultivo é requerido quando se têm alto tempo de transporte. Esta diferença não foi apresentada nas taxas de desenvolvimento embrionário após a Injeção Intracitoplasmática de Gametas (ICSI). Alm & Torner (1994) obtiveram 56% de MII cultivando por 24 horas, e 72,7% cultivando por 30 horas.

Bruck et al. (1996) trabalhando com diferentes tamanhos foliculares obtiveram diferentes taxas de MII as 36 horas de cultivo, sendo que 27% dos folículos < 10mm, maturaram. Para folículos de 11 a 20mm, a taxa foi de 46% e para folículos de 21-30mm foi de 44%, indicando que com diferentes tamanhos foliculares temos uma população heterogênea de ovócitos. Neste trabalho, o método de colheita utilizado não permite que seja feita uma seleção dos ovócitos, portanto com a utilização da técnica de fatiamento, os ovócitos obtidos são provenientes de folículos de

diferentes tamanhos, inclusive menores de 10 mm, apresentando portanto diferentes características e competência para o desenvolvimento *in vitro*.

Os resultados de maturação de ovócitos eqüinos são baixos em comparação à outras espécies de mamíferos. Numerosos estudos têm sido conduzidos na tentativa de melhorar as condições de cultivo para ovócitos eqüinos, e efeitos positivos com a adição de LH, FSH, estradiol, EGF têm sido descritos (SQUIRES, 1996). A adição de fontes de gonadotrofinas homólogas parece beneficiar as taxas de maturação. Segundo Zhang et al. (1989), ovócitos cultivados em meio suplementado com soro e hormônios gonadotróficos tiveram uma maior expansão das células do *cumulus* do que ovócitos cultivados sem a adição de hormônios. Willis et al. (1991), trabalhando com LHb, LHe e com FSH, também obtiveram melhores índices de expansão do *cumulus* com a utilização de LHe associado ao FSH (100%).

No experimento I, embora não tenha apresentado diferença estatística, numericamente o meio de cultivo HTF:BME apresentou melhores taxas de MII, tanto no total, como de MII viáveis e menor número de ovócitos degenerados. Desta forma, no experimento II deste trabalho o FSHe foi introduzido no meio de cultivo na tentativa de melhorar os índices de MII. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas em relação ao meio suplementado com FSH bovino (FSHb) e FSHe associado com Hormônio de crescimento eqüino (eGH) (37,1%; 25,8% e 29,8%, respectivamente, $p=0,545$) (Tabela 12).

Pereira (1997) trabalhou com a adição de diferentes fontes de gonadotrofinas em meio de maturação *in vitro*, com 12, 24 e 36 horas de cultivo, avaliando as taxas de MII. Os grupos com FSH suíno (FSHs) somente ou com LH suíno (LHs) + FSHs apresentaram melhores taxas de maturação (quando comparado com o meio que tinha somente LHs ou sem a adição de hormônios). Quanto às taxas de MII também houve diferença estatística significativa para o cultivo feito em 36 horas (61%). Estes resultados são corroborados por Willis et al. (1991), que cultivando ovócitos eqüinos com a adição de LHb em concentrações crescentes obtiveram, taxas de MIV em torno de 40%, verificando que a adição do LHb não afeta o índice de maturação.

Tentou-se explicar através de várias teorias os mecanismos pelos quais os hormônios gonadotróficos atuam no ovócito. Poderiam degradar substâncias inibitórias da maturação, poderiam interromper as uniões intercelulares, isolando

assim o ovócito das células da granulosa ou estimulariam um sinal positivo que promoveria a maturação. É possível, então, que o LH e o FSH atuem na maturação nuclear por um caminho dependente do aumento de AMPcíclico (AMPc) através das células da granulosa. Este aumento de AMPc poderia induzir a produção de substâncias que geram um sinal positivo e estimulam a maturação nuclear (EPPIG & DOWS, 1987; BUCCIONE et al., 1990; SUTOVSKY et al., 1993).

Foram analisados os efeitos da suplementação hormonal na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos, em meio suplementado com soro (FUKUSHIMA & FUKUI, 1985; FUKUI & ONO, 1989) ou não (YOUNIS et al., 1989; HARPER & BRACKETT, 1993; ROMERO-ARREDONDO & SEIDEL, 1996). Dados conflitantes têm sido reportados sobre as concentrações ideais de hormônios no meio de MIV, sendo que concentrações de 0,05 a 20µg/ml de FSH e 0,5 a 100µg/ml têm sido utilizadas para a espécie bovina (BRACKETT et al., 1989; HARPER & BRACKETT, 1993; KEEFER et al., 1993; ROMERO-ARREDONDO & SEIDEL, 1996; GLIEDT et al., 1996; JU et al., 1999).

Neste experimento, a falha da adição do FSHe no experimento II em melhorar as taxas de MII, diminuindo as taxas de ovócitos degenerados (36,5%, 35% e 21,3%, para os grupos FSHbov, FSHeq e FSHeq+eGH, respectivamente, p=0,448) (Tabela14) pode ter decorrido devido a falta de um estudo anterior para determinar a relação dose:efeito da adição de diferentes concentrações de FSHe no meio de cultivo. As altas taxas de ovócitos degenerados quando comparados aos índices da literatura devem ter a mesma explicação do experimento I.

Quando FSH é adicionado ao meio de maturação, aparentemente estimula as células do *cumulus* do CCO a secretar fatores positivos que podem desencadear a meiose (BYSKOV et al., 1997). A adição de FSH estimula o aumento de AMPc e a expansão das células do *cumulus* (SAEKI et al., 1991; EPPIG et al., 1992). As expansões das células do *cumulus* ocorrem por síntese de ácido hialurônico e endocitose das junções do tipo *gap* (CHEN et al., 1990). O desencadeamento da meiose foi bem representado quando as taxas de metáfase I associadas às taxas de metáfase II, foram avaliadas para o experimento II (58,8%, 60,8% e 74% para FSHbov, FSHeq e FSHeq+eGH, respectivamente p=0,518) (Tabela18).

A melhora da maturação citoplasmática é obtida com a adição de gonadotrofinas no meio de cultivo. Em suínos o LH aumenta a maturação citoplasmática estimado pela formação do pronúcleo masculino (MATTIOLI et al., 1991). Em bovinos, o FSH e o LH aumentam as taxas de fertilização e a habilidade de desenvolvimento de ovócitos bovinos maturados *in vitro* (YOSHIDA et al., 1992; ROMERO-ARREDONDO & SEIDEL, 1996). Choi et al. (2001) não obtiveram melhores taxas de desenvolvimento embrionário quando suplementaram o meio de cultivo somente com gonadotrofinas, sugerindo que fatores de crescimento como o EGF possam ser necessários ao ovócito estimulando a maturação citoplasmática em ovócitos de bovinos (LONERGAN et al., 1996; IZADIAR et al., 1998; RIEGER et al., 1998). O trabalho de RIEGER et al. (1998) também sugere que os hormônios de crescimento são a chave na regulação intrafolicular da maturação ovocitária; EGF e IGF-I potencialmente interagem com as gonadotrofinas, esteróides e outras moléculas para regular o desenvolvimento folicular *in vivo*.

Im & Park (1995), obtiveram melhores taxas de maturação e fertilização de ovócitos bovinos com a adição de 30 ng/ml de EGF ao meio de cultivo (97% versus 77%). Este efeito benéfico é melhorado com a adição de SFB, porem o SFB sozinho não é tão eficiente quanto o EGF sozinho. O SFB possui fatores não conhecidos que agem em sinergismo com o EGF na maturação ovocitária. Estudos com roedores (DEKEL & SHERIZLY, 1985; DOWNS et al., 1988) e bovinos (LORENZO et al., 1995), têm indicado que ovócitos desnudos mostram uma diminuição da QVG, sendo que aparentemente os efeitos da adição do EGF são induzidos pela ação do fator de crescimento nas células do *cumulus* presentes no ovócito. Em bovinos, a maturação citoplasmática do ovócito é estimulada pelo EGF resultando em alta taxa de desenvolvimento pós fertilização (IM & PARK, 1995).

Neste trabalho procurou-se independente da presença de SFB, incluir nos meios de cultivo, fatores de crescimento que poderiam promover melhores taxas e qualidade na maturação, incluindo-se 100 ng/ml eGH e 50 ng/ml de EGF. No entanto não pudemos observar um efeito benéfico específico da adição dos fatores de crescimento EGF e eGH.

O Hormônio de Crescimento (GH) pode agir diretamente no ovário. Em coelhas os GH estimulam o crescimento folicular, a maturação ovocitária e a produção de estradiol ovariano (YOSHIMURA et al., 1993). *In vitro*, GH estimula a

proliferação das células da granulosa e a esteroidogênese (GREGORASZCZUK et al., 2000). Os efeitos do GH na esteroidogênese depende do estágio de desenvolvimento folicular (GREGORASZCZUK et al., 2000). Além disso, os receptores de GH foram localizados em células foliculares de muitas espécies como: ratos (LOBIE et al., 1990); bovinos (LUCY et al., 1993; IZADYAR et al., 1997); ovinos (ECKERY et al., 1997); suínos (QUESNEL, 1999) e humanos (SHARARA & NIEMAN, 1994).

Os efeitos *in vitro* do GH na maturação ovocitária foram estudados por Izadyar et al. (1996), que encontraram um aceleração da maturação, indução de expansão das células do *cumulus*, e subsequente desenvolvimento embrionário. Também demonstraram uma maior migração dos grânulos corticais e formação dos fusos espermáticos (IZADYAR et al., 1998). Iga et al. (1998) mostraram aumento nas taxas de maturação nuclear e formação de blastocistos bovinos em presença de GH.

O mecanismo de ação do GH não é bem conhecido. Receptores de GH estão expressos nas células do *cumulus* de ovócitos bovinos e murinos (LOBIE et al., 1990), mas o efeito do GH na maturação ovocitária ocorre via células do *cumulus* em ambas espécies (IZADYAR et al., 1997). Em ratos, os efeitos do GH são mediados por IGF-I (APA et al., 1994). Em bovinos, alguns estudos mostraram que a ação do GH é via IGF-I (IGA et al., 1998), enquanto outros para outros pesquisadores é via AMPc sem mediação do IGF-I (IZADYAR et al., 1997). O mecanismo de ação de GH sobre as células do *cumulus* ainda não é conhecido (MARCHAL et al., 2003).

Marchal et al. (2003) testaram a adição de GH eqüino (eGH) ou LHe no meio de maturação de ovócitos eqüinos o que aumentou a expansão das células do *cumulus* em relação ao grupo controle para ovócitos coletados por Aspiração Folicular Transvaginal (TVA). O mesmo não é verdadeiro para ovócitos coletados em ovários de abatedouro. Isso pode ser explicado pela população heterogênea de folículos presentes no ovário e a impossibilidade de saber o status endocrinológico da fêmea, através da TVA os pesquisadores puderam selecionar uma população de ovócitos responsivo ao GH.

A adição de LHe ou eGH no meio de cultivo aumenta significativamente a porcentagem de MII (32% para o controle versus 51% para LHe e 43% para eGH, $p < 0,05$). Quando Marchal et al. (2003) adicionaram pGH para o cultivo de ovócitos

suínos, não houve melhora na maturação citoplasmática e nas taxas de desenvolvimento embrionário. Neste trabalho a adição de eGH no meio de cultivo do experimento II não melhorou as taxas de MII. Este fato é atribuído a falta de estudo anterior que estabelece-se a relação dose:efeito para o eGH, sendo que a concentração adicionada ao meio de cultivo foi de 100ng/ml. Esta dose foi retirada de trabalhos com *outras* espécies. A adição de 100ng/ml de GH ovino aumenta a porcentagem de QVG de ovócitos murinos (APA et al., 1994). A adição de 10 a 1000ng/ml de GH bovino aumenta a porcentagem de MII e a maturação citoplasmática de CCOs bovinos com migração de grânulos corticais e formação de blastocistos (IZADYAR et al., 1997; IGA et al., 1998). Embora não tenha ocorrido uma influência positiva nas taxas de MII, a adição de FSH e eGH no meio de cultivo levou a uma aparente diminuição nas taxas de ovócitos degenerados expressas na Tabela 14. Além disso, apesar dos índices de maturação nuclear não terem diferido entre os grupos, os ovócitos maturados em HTF:BME, em presença de FSH apresentaram maior semelhança morfológica com ovócitos obtidos após maturação *in vivo* (GRONDHAL et al., 1995; LANDIM-ALVARENGA et al., 2000).

Algumas diferenças entre o processo *in vivo* e *in vitro* são descritas. A retomada da meiose e a maturação nuclear ocorrem mais rapidamente durante a maturação *in vitro* (GORDON, 1994). Determinadas proteínas são sintetizadas durante os últimos estágios da maturação *in vivo*, o que não ocorre *in vitro* e a expansão das células do *cumulus* é muito mais intensa durante a maturação *in vivo* (HENDRIKSEN et al., 2000). A investigação comparada da competência de desenvolvimento de ovócitos maturados *in vivo* e ovócitos maturados *in vitro* tem sido bastante escassa. Estudos pioneiros demonstraram uma menor competência para o desenvolvimento embrionário de ovócitos maturados *in vitro* e transferidos para ovidutos (GREVE et al., 1987; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

Na maior parte dos estudos (WILLIS et al., 1991; SHABPAREH et al., 1992; CHOI et al., 1993; DEL CAMPO et al., 1995), as taxas de maturação são baseadas no número de ovócitos que desenvolvem-se até Metáfase II, associados à avaliação da maturação citoplasmática com migração dos grânulos corticais, formação dos fusos meióticos e integridade da membrana citoplasmática (GOUDET et al., 1997a; GUIGNOT et al., 1999). Parâmetros nucleares e citoplasmáticos são indicadores do desenvolvimento ovocitário, mas não refletem o desenvolvimento da competência. A

transferência cirúrgica de ovócitos eqüinos maturados *in vitro* pode ser utilizada como uma forma de determinar a viabilidade ovocitária (ZHANG et al., 1989; CARNEVALE & GINTHER, 1993; HINRICHS et al., 1997; HINRICHS et al., 1998a; HINRICHS et al., 1998b; HINRICHS et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000).

A colheita e transferência de ovócitos eqüinos foi primeiramente realizada em 1988 (McKINNON et al., 1988). No entanto, o sucesso da técnica somente foi relatado em 1993 quando Carnevale & Ginther (1993) obtiveram taxas de desenvolvimento embrionário de 92% após a transferência de ovócitos maturados *in vivo*. Carnevale et al. (2000), trabalhando com ovócitos coletados 24h após a administração de hCG e mantidos em estufa à 38,5°C e 5% de CO₂ em ar por 12h para finalizar a maturação, obtiveram 57% de vesículas embrionárias aos 25º dia pós transferência. A transferência de ovócitos de doadoras em um programa comercial resulta em taxas de prenhez de 40% aos 16º dia de gestação (CARNEVALE et al., 2001b).

Taxas de 82% e 10% de gestação foram conseguidas para a transferência de ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro* respectivamente (SCOTT et al., 2001). Zhang et al. (1989) obtiveram 24% de blastocistos recuperados no oitavo dia após a transferência de ovócitos maturados *in vitro* (24 a 36h em TCM 199). Ovócitos maturados *in vitro* podem ser transferidos ao oviduto de receptoras resultando no desenvolvimento de embriões. No entanto, as baixas taxas de gestação ou produção embrionária refletem a necessidade de mais pesquisas sobre a maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos (SCOTT et al., 2001).

Ovócitos coletados de folículos pré-ovulatórios através de Aspiração Folicular Transvaginal (TVA) resultam em taxas de 82% de gestação após TO. Em contrapartida, ovócitos coletados durante a fase de diestro e cultivados por 36-38 horas *in vitro* antes da transferência levam a taxas de gestação de 7%, quando os ovócitos foram coletados de ovários de abatedouro e maturados *in vitro* por 36-38 horas as taxas de gestação pós transferência são de 10% (SCOTT et al., 2001). No experimento II deste trabalho, foram obtidas taxas de 10% e 6,7% de gestação para cada égua após a Transferência de ovócitos maturados *in vitro*. Landim-Alvarenga (2002), trabalhando com fertilização xenogênica de ovócitos eqüinos maturados *in vitro* em oviduto de coelhas, obteve taxas de 15% de fertilização, a melhora dos índices de fertilização dos ovócitos eqüinos maturados *in vitro* foi atribuída a

complexidade de fatores do interior do oviduto das coelhas. Esta combinação de resultados demonstra que ovócitos maturados *in vivo* levam a altas taxas de desenvolvimento embrionário, enquanto que para os cultivados *in vitro*, as taxas são muito baixas, indicando que os sistemas de maturação ovocitária *in vitro* ainda não são adequados para a maturação nuclear e citoplasmática (SQUIRES et al., 2003). Quando se trabalha com TO de ovócitos maturados *in vivo* de éguas velhas as taxas tendem a diminuir para 32% (CARNEVALE & GINTHER, 1994).

Ovócitos eqüinos têm a capacidade de terminar a maturação ovocitária no oviduto. Ovócitos coletados por TVA 12 horas antes da ovulação e transferidos diretamente ao oviduto, se desenvolveram em vesículas embrionárias na mesma proporção dos coletados por TVA 12 horas antes de ovular e mantidos por 12 horas em estufa de CO₂ em ar ou dos coletados 35 horas após a administração de hCG (CARNEVALE et al., 2000). No entanto, ovócitos coletados de éguas em diestro e transferidos imediatamente, não resultam em desenvolvimento embrionário, provavelmente porque estes ovócitos estão em estágio de VG ou QVG (ALM & TORNER, 1994; DEL CAMPO et al., 1995).

A utilização de éguas cíclicas na transferência de gametas favorece eventos como o transporte espermático, capacitação e fertilização que são potencialmente sincronizados com os eventos da ovulação, incluindo mudanças nas secreções de esteróides no folículo pré-ovulatório e desenvolvimento de corpo lúteo (PICKETT et al., 1989). Porém, para que estas receptoras possam ser utilizadas, deve haver uma sincronia reprodutiva entre doadora e receptora para que ambas estejam na mesma fase do ciclo estral, sob a influência dos mesmos hormônios no momento da transferência. Além disso, a receptora deve ser inseminada antes da transferência. Assim, seu folículo pré-ovulatório aspirado para que não haja a possibilidade desta vir a gestar um potro que não seja o da transferência de ovócito (PALMER et al., 1997). Desta forma a preparação das receptoras cíclicas dificulta a utilização da técnica. A utilização de éguas não cíclicas submetidas à terapia com estrógenos e progesterona pode mimetizar as condições hormonais e morfológicas de uma égua com atividade folicular, e assim ser utilizada com sucesso na transferência de gametas (CARNEVALE et al., 2001a).

As éguas não cíclicas tratadas com hormônios submetidas a TO e prenhes aos 16º dia pós transferência devem iniciar o desenvolvimento de corpos lúteos

acessórios no 37º de gestação, correspondendo ao desenvolvimento dos cálices endometriais, eliminando assim a necessidade de continuar o tratamento com progestágeno. No entanto, pode acontecer de poucos ou somente um folículo se luteinizar, dependendo da época do ano na qual a transferência for realizada (GINTHER, 1992). Portanto a recomenda-se que o tratamento somente seja interrompido no 100º dias de gestação, quando a placenta passa a produzir a concentrações adequadas de progesterona para manter a gestação (HINRICHS et al., 1987).

Na inseminação das éguas submetidas a TO sugere-se que na utilização de sêmen de baixa qualidade ou resfriado deve-se inseminar a receptora 12h antes e 2h após a transferência (1×10^9 SPTZ/dose). Para sêmen fresco de garanhões férteis somente 12h antes (2×10^9 SPTZ/dose) seria o suficiente para se obter bons índices de prenhez (CARNEVALE et al., 2001a). Um intervalo entre a inseminação e a transferência menor que 12h pode afetar o mecanismo de limpeza uterino devido a redução da motilidade uterina após a cirurgia (WILLIAMSON et al., 1987).

Scott et al. (2001) obtiveram acúmulo de fluido intrauterino em 27% das éguas após a transferência. Hinrichs et al. (1998b), inseminaram as receptoras 1 dia antes e imediatamente após a transferência, e 82% apresentaram fluido intrauterino, sendo que as taxas de gestação foram inferiores para as que mantiveram o líquido uterino 2 dias após a transferência. A inseminação pós transferência é somente necessária quando trabalha-se com um garanhão que tenha pobre qualidade espermática (CARNEVALE et al., 2001a).

No experimento II, deste trabalho, dos seis animais que receberam os ovócitos na TO, dois apresentaram líquido no lúmen uterino no 15º dia após a transferência (Tabela 19). Isto foi atribuído a utilização de um protocolo de duas inseminações, sendo uma pré e outra pós transferência, e também, pelo fato da administração exógena de progesterona impedir a abertura da cérvix, com conseqüente expulsão do conteúdo uterino.

Carnevale et al. (2002) reportaram a manutenção de gestações obtidas de ovários de éguas eutanaziadas. Os ovários foram transportados de 30 minutos a 10 horas, dependendo da distância percorrida. Os ovócitos recuperados foram maturados *in vitro* e transferidos a receptoras, destas, 4 entre 10 receptoras ficaram prenhas. Porém, três das quatro gestações foram perdidas aos dias 38, 45, 62, e

houve o nascimento de um potro. Estudos adicionais devem ser realizados para indicar o melhor método de transporte, colheita e transferência dos ovócitos.

Todos os tratamentos do experimento II foram eficientes em reiniciar a meiose (58,8%, 60,8% e 74% para FSHbov, FSHeq e FSHeq+eGH, respectivamente, $p=0,518$). Isso foi comprovado pela obtenção de duas gestações após a Transferência de Ovócitos (Tabela 19). Os meios que promoveram as gestações foram dos grupos: FSH bov e FSHeq+eGH. Acredita-se que com o aumento do número de transferências seriam obtidas gestações em todos os grupos testados, tendo em vista que o trabalho foi realizado com receptoras de baixa condição corporal e sem histórico reprodutivo. As gestações foram mantidas até o 90º dia com progestágenos, e as previsões de parto são para Setembro de 2004.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos I e II, conclui-se que:

- 1) A utilização dos meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME no cultivo ovocitário, não resultou em diferenças entre as taxas de metáfase II.
- 2) Na análise ultra-estrutural, os ovócitos maturados em meio TCM 199 e SOFaa, apresentaram sinais de maturação citoplasmática incompleta, e exibiram características de reação cortical prematura.
- 3) A utilização do meio HTF:BME, aparentemente foi benéfica à morfologia citoplasmática.
- 4) As taxas de maturação nuclear não foram afetadas pela adição de FSHb, FSHe e FSHe+eGH no meio HTF:BME.
- 5) A adição de FSHe no meio HTF:BME, resultou em uma melhora significativa na morfologia citoplasmática. Porém, com a adição de FSHb ou FSHe+eGH, estes resultados não foram repetidos.
- 6) Todos os tratamentos do experimento I e II foram eficientes em reiniciar a meiose, portanto, um aumento no número de transferências de ovócitos maturados *in vitro* poderia resultar em melhores taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário e fetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ADAMS, C. E. Effects of maternal age on ovulations, fertilization and embryonic development. In: BLANDAU, R. J. **Aging gametes**. Basel: Kargers, 1975, p. 231-248.

ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; D'ERCOLE A J.; SVOBODA, M. E.; VAN WYK, J. J.; Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocr. Rev.**, v. 6, p. 400-420, 1985.

AGUILAR, J. J.; WOODS, G. L.; MIRAGAYA, M. H.; OLSEN, L. M.; VANDERWALL, D. K. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on in vitro maturation of equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 56, p. 745-758, 2001.

AKUFO, E.; PHELPS, D. A.; TIBITTS, F. D.; FOOTE, W. D. Influence of follicular components on oocyte meiosis in vitro. **Theriogenology**, v. 30, p. 643-648, 1988.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. The endoplasmic reticulum. **Mol. Biol. of the Cell**. 2^oed. New York: Garland Publish, 1989, p. 433-450.

ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 901-905, 2002.

ALM, H.; TORNER, H. *In vitro* maturation of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 345, 1994.

ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F. Gap junctions between the oocyte and comparison follicle cells in the mammalian ovary. **J. Cell. Biol.**, v. 71, p. 680-686. 1976.

APA, R.; LANZONE, A.; MICELI, F.; MASTRANDREA, M.; CARUSO, A.; MANCUSO, S.; CANIPARI, R. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 106, p. 207-212, 1994.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943-956, 1996.

ASCH, R. H.; ELLSWORTH, J. P.; BALMACEDA, J. P.; WONG, P. C. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. **Lancet**, v. 2, p. 1034-1035, 1984.

ASSEY, R. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 37, p. 335-344, 1994.

BALL, B. A.; IGNOTZ, G. G.; BRINSKO, S. P.; THOMAS, P. G. A.; MILLER, P. G.; ELLINGTON, J. E.; CURRIE, W. B. The *in vitro* block to development and initiation of transcription in early equine embryos. **Equine Vet. J.**, suppl. 15, p. 87-90, 1993.

BARRISCO, M. J.; MERKT, H.; BADER, H.; HOPPEN, H. O An attempt to characterize follicles and oocytes from mares. In: PROC. 12TH INTERN. CONG. ANIM. REPROD., 1992, p. 375-377.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. In: **Human reproduction update**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 91-148.

BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. La fecondation *in vitro* chez les equides. **Rec. Med. Vet.**, v. 168, p. 993-1003, 1992.

BEZARD, J.; PALMER, E. *In vitro* maturation of horse oocytes from slaughtered ovaries. In: PROC. 12TH INTERN. CONG. ANIM. REPROD., 1992. p. 315-317.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 41, p. 54-62, 1995.

BRACKETT, B. G.; YOUNIS, A I.; FAYER-HOSKEN, R. A Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. **Fertil. Steril.**, v. 52, p. 319-324, 1989.

BRINSKO, S. P.; BALL, B. A.; ELLINGTON, J. E. In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. **Theriogenology**, v. 44, p. 461-469, 1995.

BROWDER, L. W. Oogenesis. In: Developmental Biology. Ed: Saunders College Publishing, p. 248-323, 1984.

BRÜCK, I.; GRONDAHL, C.; HOST, T.; GREVE, T. In vitro maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. **Theriogenology**, v. 46, p. 75-84, 1996.

BRUCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Vet. J.**, v. 24, p. 58-59, 1999.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol. Reprod.**, v. 43, p. 543-547, 1990.

BUEHR, M. Oogenesis. In: HYTTEL, P., **Embryotechnology** – cell biological and applied aspects. Copenhagen: Summerschool preceedings RVAU, 1994. p. 3.

BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y.; HOSSAINI, A.; GUOLIANG, X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. **Mol. Reprod. Dev.**, p. 46, p. 296-305, 1997.

CARNEIRO, G. F.; LIU, I. K. M.; HYDE, D.; ANDERSON, G. B.; LORENZO, P. L.; BALL, B. A. *Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation.* **Mol. Reprod. Devel.**, v. 63, p. 451-458, 2002a.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PENGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. *Influence of Insulin-like growth factor – I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes.* **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 899-905, 2001.

CARNEIRO, G. F.; MUNRO, C. J.; LEUTENEGGER, C. M.; LORENZO, P. L.; BALL, B. A.; LIU, I. K. M. *Potential relevance of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vivo maturation of equine oocytes during follicular growth.* **Theriogenology**, v. 58, p. 685-688, 2002b.

CARNEVALE, E. M. Gamete intrafallopian tyransfer. **Vet. Clin. North Am.**, v. 12, p. 47-60, 1996.

CARNEVALE, E. M.; ALVARENGA, M. A; SQUIRES, E. L.; CHOI, Y. H. Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. In:PROC. ANN. CONF SOC. THERIOGENOLOGY, 1999. p.44. (Abstract)

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration as transfer of oocyte in the mare.**J Equine Vet Sci**, v. 13, p. 331-333, 1993.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. In: PROC. 6 INT. SYMP. EQUINE REPROD., 1994. p. 51-52.

CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J.; COUTINHO DA SILVA, M. A; CHECURA, C. M.; SCOGGIN, C. F.; SQUIRES, E. L. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 305-314, 2001a.

CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J.; COUTINHO DA SILVA, M.; SQUIRES, E. L. Pregnancies obtained after collection and transfer of oocytes from ovaries of euthanized mares. **J AVMA**, 2002, in press.

CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J.; SQUIRES, E. L.; COUTINHO DA SILVA, M. A; SCOTT, T. J.; SEIDEL, G. E. Comparison of gift and oocyte transfer after oviductal or *in vitro* culture of preovulatory oocytes. **Theriogenology**, v. 54, p. 981-987, 2000.

CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L.; MACLELLAN, L. J.; ALVARENGA, M. A; SCOTT, T. J. Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 218, p. 87-91, 2001b.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN-LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 43, p. 1115-1129, 1995.

CHEN, L.; WERT, S. E.; HENDRIX, E. M.; RUSSELL, P. T.; CANNON, M.; LARSEN, W. J. Hyaluronic acid synthesis and gap junctions endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 26, p. 236-247, 1990.

CHOI, T.; AOKI, F.; MORI, M. Activation of P34 cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycle in mouse oocytes and embryos. **Development.**, v.113, p. 789-795, 1991.

CHOI, Y. H.; CARNEVALE, G. E.; SEIDEL, G. E.; SQUIRES, E. L. effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**, v. 56, p. 661-670, 2001.

CHOI, Y. H.; HOSHI, S.; BRAUN, J.; SATO, K.; OGURI, N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by slicing of ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 959-966, 1993.

COCHAN, R.; MEINTJES, M.; REGGIO, B.; HYLAND, D.; CARTER, J.; PINTO, C.; CARTER, J.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R. A Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 18, p. 736-740, 1998.

CRAN, D. G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. **J. Reprod. Fertil.**, v. 74, p. 237-245, 1985.

CRAN, D. G.; MOOR, R. M. Programming the oocyte for fertilization. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E.R.S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, 1990. p. 35-50.

CRAN D. G.; MOOR, R. M.; HAY, M. F. Fine struture of the sheep oocyte during antral follicle development. **J. Reprod. Fertil.**, v. 59, p. 125-132, 1980.

CROZET, N.; KANKA, J.; MOTLIK, J.; FULKA, J. Nucleolar fine struture and RNA Synthesis in bovine oocytes from antral follicles. **Gamete Res.**, v. 14, p. 65-73, 1986.

DEDIDEU, T.; GALL, L.; CROZET, N. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 351-358, 1996.

DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. **Biol. Reprod.**, v. 38, p. 517-521, 1988.

DEKEL, N.; SHERIZLY, I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. **Endocrinology.**, v. 116, p. 406-409, 1985.

DEL CAMPO, M. R.; DONOSO, M. X.; PARRISH, J. J. *In vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 20, p. 37, 1990.

DEL CAMPO, M. R.; DONOSO, M. X.; PARRISH, J. J.; GINTHER, O. J. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes. **Equine Vet. Sci.**, v. 10, p. 18-22, 1992.

DEL CAMPO, M. R.; DONOSO, M. X.; PARRISH, J. J.; GINTHER, J. O. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for *in vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p. 1141-1153, 1995.

DELL'AQUILA, M. E.; CHO, Y. S.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G. M.; MARITATO, F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro* matured equine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1139-1156, 1997.

DESJARDINS, M.; KING, W. A.; BOUSQUET, D. *In vitro* maturation of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 23, p. 187, 1985.

DOULCIBELLA, T.; ANDERSON, E.; ALBERTINI, D. F.; AALBERG, J.; RANGARAJAN, S. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. **Dev. Biol.**, v. 130, p. 184-197, 1988.

DOULCIBELLA, T.; KURASAWA, S.; RANGARAJAN, S.; KOPF, G. S.; SCHULTZ, R. M. Precocious loss of cortical granules during oocyte meiotic maturation and correlation with zona-induced modification of the zona pellucida. **Dev. Biol.**, 137, p. 46-55, 1990.

DOWNS, S. M. The maintenance of meiotic arrest in mammalian oocytes. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, 1990. p. 5-16.

DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 65-79, 1993.

DOWNS, S. M.; DANIEL, S. A. J.; EPPIG, J. J. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. **J. Exp. Zool.**, v. 245, p. 86-89, 1988.

DRINACOURT, M. A.; PRUNIER, A.; PALMER, E.; MARIANA, J. C. Seasonal effects on ovarian follicular development in pony mares. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 23, p. 207-215, 1983.

DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; PALMER, E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 milimeters in mares. **Biol. Reprod.**, v: 1, p. 223-241, 1995.

ECKERT, J.; PUGH, P. A.; THOMPSON, J. G.; NIEMANN, H.; TERVIT, H. R. PVA and BSA have different effects on development and metabolism of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 49, p. 231, 1998.

ECKERY, D. C.; MOELLER, C. L.; NETT, T. M.; SAWYER, H. R. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 507-513, 1997.

ENDERS, A. C.; LIU, I. K.; BOWERS, J.; LANTZ, K. C.; SCHLAFKE, S.; SUAREZ, S. The ovulated ovum of the horse: Cytology of nonfertilized ova to pronuclear stage ova. **Biol. Reprod.**, v. 37, p. 453-466, 1987.

EPPIG, J. J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from antral follicles. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 824-830, 1991.

EPPIG, J. J.; DOWNS, S. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development *in vitro*: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. **Dev. Biol.**, v. 119, p. 313-321, 1987.

EPPIG, J. J.; SCHOEDER, A. C.; O'BRIEN, M. J. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. **J. Reprod. Fertil.**, v. 95, p. 119-127, 1992.

ERICE, I.; GIL, L.; JOSA, A.; ECHEGARAY, F.; MARTINEZ, F.; ESPINOSA, E. Effect of mare's age and recovery methods on the recovery rate of equine follicular oocytes for IVM procedures. **Theriogenology**, v. 49, p. 735-741, 1995.

EYESTONE, W. H.; BOER, H. A FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. **Theriogenology**, v. 39, p. 216, 1993.

FAYER-HOSKEN, R. A; MILLER, C. C.; WILLIS, L. P.; BROOKS, P.; CAUDLE, B. An overview of collection, characterisation and maturation *in vitro* of equine gametes. **Equine Vet. J.**, supl: 15, p. 53-56, 1993.

FLEMMING, W. N.; SAACKE, R. G. Fine struture of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 29, p. 203-213, 1972.

FLOOD, M. R.; GAGE, T. L.; BINCH, T. D. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. **Theriogenology**, v. 39, p. 823-833, 1993.

FRANZ, L., C.; MEIRA, C.; SQUIRES, E., L.; SEIDEL, G., E. Effect of time and temperature during transport of ovaries on nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p.718, 2002 (Abstract).

FUKUI, Y.; ONO, H. Effects of sera, hormones, and granulosa cells added to culture médium for iv vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 86, p. 501-506, 1989.

FUKUSHIMA, M.; FUKUI, Y. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocyte matured in vitro. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 9, p. 323-332, 1985.

FULKA, J. Jr.; OKOLSKI, A. Culture of horse oocytes *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 61, p. 213-215, 1981.

GALLICANO, G. I.; YOUSEF, M. C.; CAPCO, D. G. PKC: a pivotal regulator of early development. **Bioessays**,v. 19, p. 29-36, 1997.

GEBAUER, R. L.; XU, W.; COOPER, G. M.; RICHTER, J. D. Translational control by cytoplasmic polyadenilation of c-Mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. **Embo. J.**, v. 13, p. 5712-5720, 1994.

GESCHWIND, H.; DEWEY, R.; HUGHES, J. P. Plasma LH levels in the mare during the oestrus cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 23, p. 207-212, 1975.

GHADIALLY, F. N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. In: **Cytoplasmatic matrix and its inclusions**, London: Butterworths, 1988. cap. 13. p. 953-1042.

GILCHRIST, R. B.; NAYUDU, P. L.; NOWSSHARI, M. ^a; HODGES, J. K. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 1234-1243, 1995.

GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. **J. Cell Biol.**, v. 78, p. 58-75, 1978.

GINTHER, O. J. Maternal aspects of pregnancy. In: **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2. ed. Wisconsin: Equiservices, 1992. p. 173-344.

GLIEDT, D. W.; ROSENKRANS, C. F. Jr.; RORIE, R. W.; MUNYON, A. L.; PIERSON, J. N.; MILLER, G. F.; RAKES, J. M. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p. 536-542, 1996.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p. 645-663.

GORDON, I.; LU, K. H. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. **Theriogenology**, v. 33, p. 77-88, 1990.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BÉZARD, J.; GÉRARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 563-570, 1998a.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BÉZARD, J.; GÉRARD, N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, α -inibina, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 1120-1127, 1999.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; BELIN, F.; DUCHAMP, G.; PALMER, E.; GERARD, N. Oocyte competence for in vitro maturation is associated with Histone H1 Kinase Activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 456-462, 1998b.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. **Biol Reprod**, v. 57, p. 232-245, 1997a.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to *in vitro* maturation in the mare? **Equine Vet. J.**, suppl.25, p. 54-59, 1997b.

GOUDET, G.; LECLERCQ, L.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GUILLAUME, D.; PALMER, E. Chorionic gonadotrophin secretion is associated with an inhibition of follicular growth and an improvement in oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 760-768, 1998.

GREGORASZCZUK, E. L.; BYLICA, A.; GERTLER, A. Response of porcine theca and granulosa cells to GH during short-term *in vitro* culture. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 58, p. 113-125, 2000.

GREVE, T., XU, K. P., CALLESEN, H. et al. *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*. **J. Vitro Fertil. Embryo Transfer.**, v. 4, p. 281-285, 1987.

GRONDAHL, C.; ERIKSEN, T.; GRONDAHL NIELSEN, C.; GREVE, T.; HYTTEL, P. RNA synthesis and ultrastructure of equine zygotes and embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 209, 1994.

GRONDAHL, C.; GRONDAHL NIELSEN, C.; ERIKSEN, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. *In vivo* fertilization and initial embryogenesis in the mare. **Equine Vet. J.**, suppl. 15, p. 79-83, 1993.

GRONDAHL, C.; HOST, T.; BRUCK, I.; VIUFF, D.; BEZARD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. *In vitro* production of equine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 1, p. 299-307, 1995.

GUIGNOT, F.; BEZARD, J.; PALMER, E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 52, p. 757-766, 1999.

GUIXUE, Z., LUCIANO, A. M., COENEN, K. et al. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence, **Theriogenology**, v. 55, p. 1733-1743, 2001.

HADEK, R. Submicroscopic study on the sperm-induced cortical reaction in the rabbit ovum. **J. Ultrastructure Res.**, v. 9, p. 99-109, 1963.

HADEK, R. The structure of the mammalian egg. **Internatiol. Reviw of cytology**, v. 18, p. 29-71, 1965.

HARPER, K. M.; BRACKETT, B. G. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 409-416, 1993.

HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. **Dev. Biol.**, v. 126, p. 242-252, 1988.

HAWLEY, L. R.; ENDERS, A C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morpholigy within the ovarian follicle. **Biol. Reprod.**, v. 1, p. 243-252, 1995.

HAZELEGER N. L.; HILL, D. J.; STUBBINGS, R. B.; WALTON, J. S. Relationship of morfology and follicular fluid enviroment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 43, p. 509-522, 1995.

HENDRIKSEN, P. J. M., VOS, P. L. A. M., STEENWEG, W. N. M. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes.

Theriog., v. 53, p. 11-20, 2000.

HINRICHS, K. The relationship of follicular atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morfology in the mare. **Theriogenology**, v. 36, p. 157-168, 1991.

HINRICHS, K.; BETSCHART, R. W.; McCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Effect of time of aspiration on pregnancy rate after oocyte in the mare. In: 7th. INTL SYMP EQUINE REPROD., 1998a. p. 129-130.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; WALCKENAER, B. E.; VARNER, D. D. Interactions between time of oocyte recovery (immediate vs delayed) and duration of in vitro maturation on developmental competence of horse oocytes. HAVEMEYER FOUNDATION WORKSHOP: Transporting Gametes and Embryos, Brewster: Massachusetts-USA, 2003, p. 8. (Abstract).

HINRICHS, K.; DIGIORGIO, L. M. Embrionic development after intrafollicular transfer of immature horse oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. 44, p. 369-374, 1991.

HINRICHS, K.; FRIEDMAN, P. P.; MARTIN, M. G. Evaluation of *in vitro* maturation of horse oocytes using fluorescence microscopy. PROC. 12TH INTERN. CONG.ANIM.REPROD., 1992. p. 330-332.

HINRICHS, K.; MARTIN, M. G.; SCHMIDT, A L.; FRIEDMAN, P. P.; Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. **J.Reprod. Fertil.**, v. 104, p. 149-156, 1995.

HINRICHS, K.; MATTHEWS, G. L.; FREEMAN, D. A; TORELLO, E. M. Oocyte transfer as a clinical procedure in the mare. In: PROC 43rd. AMER ASSOC EQUINE PRACT., 1997. p. 187-191.

HINRICHS, K.; MATTHEWS, G. L.; FREEMAN, D. A; TORELLO, E. M. Oocyte transfer in mares. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 212, p. 982-986, 1998b.

HINRICHS, K.; PROVOST, P. J.; TORELLO, M. Birth of a foal after oocyte transfer of a nonovulating hormone-treated recipient mare. **Theriogenology**, v. 51, p. 1251-1258, 1999.

HINRICHS, K.; SERTICH, P. L.; PALMER, E.; KENNEY, R. M. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. **J. Reprod. Fertil.**, v. 80, p. 395-401, 1987.

HINRICHS, K.; SCHMIDT, A L.; FRIEDMAN, P. P.; SELGRATH, J. P.; MARTIN, M. G. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 363-370, 1993.

HOCHI, S.; CHOI, Y. H.; BRAUN, J. W.; SATO, K.; OGURI, N. Factors affecting the recovery of follicular oocytes from horses and their *in vitro* maturation. **Jpn. J. Equine Sci.**, v. 4, p. 145-150, 1993.

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

HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 38, p. 35-47, 1989.

HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrasture of the final nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Anat. Embryol.**, v. 176, p. 35-40, 1987.

IGA, K.; NIWA, K.; BARTKE, A. Recombinant bovine growth hormone stimulates nuclear maturation of bovine oocytes in vitro and promotes subsequent embryonic development. **J. Reprod. Dev.**, v. 44, p. 45-52, 1998.

IM, K. S.; PARK, K. W. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. **Therig.**, v. 44, p. 209-216, 1995.

IRVINE, C. H. G.; ALEXANDER, S. L. The dynamics of gonadotrophin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. **J. Endocrinol.**, v.140, p. 283-95, 1994.

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 372-377, 1996.

IZADYAR, F.; HAGE, W. G.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. In: IZADYAR, F. **Regulation of bovine oocyte maturation-The role of activin and growth hormone**. Duurstede: ADDIX, 1997. cap.5, p. 65-83.

IZADYAR, F.; HAGE, W. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 49, p. 444-453, 1998.

JELINKOVA, L.; KUBELBA, M.; MOTLIK, J.; GUERRIER, P. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 37, p. 210-215, 1994.

JU, J. C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 336-340, 1999.

KEEFER, C. L.; STICE, S. L.; DOBRINSKY, J. Effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during bovine in vitro maturation on development following in vitro fertilization and nuclear transfer. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 36, p. 469-474, 1993.

KENNEDY, J. F.; DONAHUE, R. P. Human oocytes: maturation in chemically defined media. **Science**, v. 164, p. 1292-1293, 1969.

KING, W. A. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v. 34, p. 229-250, 1990.

KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Influence of semi-defined culture media on the development, cell number and metabolism of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 49, p. 207, 1998.

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

LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Estudo da maturação nuclear, ultra-estrutura e fertilização xenogênica de ovócitos equinos maturados in vitro**. 2002. 180p.Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BOYAZOGLU, S. E. A.; SEIDEL, G. E. Jr.; SQUIRES, E. L. Effect of fetuin on zona hardening and the distribution of cortical granules In equine oocytes matured In vitro. PROC. 5TH EET SYMP., p. 18, 2000.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M.; PONCHIROLLI, C. B.; ALVES, D. F.; MACLELLAN, L. J. Effect of culture media on in vitro maturation of equine oocytes. . **Theriogenology**, v. 57, p. 725, 2002. (Abstract).

LEE, E. S.; PUGH, P. A.; ALLEN, N. W.; FUKUI, Y.; THOMPSON, J. G. Glucose and pyruvate utilization by fresh and frozen-thawed day 7 IVP bovine blastocysts cultured in PVA-or BSA supplemented medium. **Theriogenology**, v. 49, p. 233, 1988.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L., CRITSER, E. S., EYESTONE, W. H. Developmental potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biol. Reprod.**, v. 36, p. 376-383, 1987.

LOBIE, P. E.; BREIPOHL, W.; ARARGON, J. G.; WATERS, M. J. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. **Endocrinology**, v. 126, p. 2214-2221, 1990.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; LANGENDONCKT, A. V.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and

preimplantation embryo development in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 1420-1429, 1996.

LONERGAN, P.; SHARIF, H.; MONOGHAN, P. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Theriogenology**, v. 37, p. 248, 1992. (Abstract).

LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 44, p. 109-118, 1995.

LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. **J. Reprod. Fertil.** v. 101, p. 697-701, 1994.

LOVE, L. B.; CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Effect of ovary estocage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 59, p. 765-774, 2003.

LUCY, M. C.; COLLIER, R. J.; KITCHELL, M. L.; DIBNER, J. J.; HAUSER, S. D.; KRIVI, G. G. Immunohistochemical and nuclei acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 1219-1227, 1993.

MARCHAL, P.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GERARD, N.; MERMILLOD, P.; GOUDET, G. Effect of growth hormone (GH) on In vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluron syntethases, and connexis 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression In equine and porcine species. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 1013-1022, 2003.

MARCOS, M. V.; SPELL, A R.; BUTINE, M. D.; ARNS, M. J. Influence of cumulus cells on in vitro maturation and fertilization of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 263, 1996. (Abstract).

MASUI, Y.; CLARKE, H. J. Oocyte maturation. *Intern. Rev. Cytol.*, v. 57, p. 185-282, 1979.

MASUI, Y.; MARKERT, C. L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. **J. Exp. Zool.**, v. 177, p. 129-146, 1971.

MATTIOLI, M.; BACCI, M. L.; GALEATI, G.; SEREN, E. Effect of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 36, p. 95-105, 1991.

MAY, J. V.; FROST, J. P.; SCHOMBERG, D. W. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor- β on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. **Endocrinology**, v. 123, p. 168-179, 1988.

McCUE, P. M.; FLEURY, J. J.; DENNISTON, D. J. Oviductal insemination in the mare. In: PROC 7th INTERNET SYMP EQUINE REPROD, 1998. p. 133-134.

McCUE, P. M.; HUGHES, J. P.; LASLEY, B. L. Effects on ovulation rate of passive immunisation of mares against inhibin. **Equine Vet. J.**, v. 15, p. 103-106, 1993.

McKERNES, K. W. Structure and function of the gonadotrophins. In: **Regulation of gene expression in the nucleus by gonadotrophins**. New York: Plenum, 1978. p. 315-338.

McKINNON, A O; CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L.; VOSS, J. L.; SEIDEL, G. E. Heterogenous and xenogenous fertilization of *in vivo* matured equine oocytes. **J Equine Vet. Sci.**, v. 8, p. 143-147, 1988.

MEHTA, T. S.; KIESSLING, A. A. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. **Biol. Reprod.**, v. 43, p. 600-606, 1990. (Abstract).

MEINTJES, M.; BELOW, M. S.; PAUL, J. B.; BROUSSARD, J. L.; LI, L. Y.; PACCAMONTI, D.; EILTS, B. E.; GODKE, R. A Transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval in cyclic and pregnant horse and pony mares for *in vitro* fertilization. **Biol. Reprod.**, v. 1, p. 281-292, 1995.

MILLER, K. F.; BERG, S. L.; SHARP, D. C. Concentrations of circulating gonadotrophins during various reproductive states in the mare. **Biol. Reprod.**, v. 22, p. 744-750, 1980.

MINOIA, P.; CINONE, M.; SCIORSCI, R. L.; PERRONE, P. Attività follicologenetica nel corso dell'anno nella cavalla. In: PROC. XLVII NAT. CONGR. VET. SCI. 1993. p. 521-524.

MLODAWSKA, W.; TISCHNER, M.; OKOLSKI, A. Morphology of equine oocytes as affected by follicular diameter and season. In: PROC. 13TH INT. CONGR. ANIM. REPROD. 1996. p. 106. (Abstract).

MOOR, M. R.; OSBORN, J. C.; CRAN, D. G.; WALTERS, D. E. Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 61, p. 347-365, 1981.

MOOR, M. R.; POLGE, C.; WILLADSEN, S. M. Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 56, p. 319-335, 1980.

MOTILIK, A W.; KUBELKA, M. *Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes.* **Mol. Reprod. Dev.**, v. 27, p. 366-375, 1990.

MURRAY, A W. The cell cycle as a cdc2 cycle. **Nature**, v. 342, p. 14-15, 1989.

MURRAY, A W.; KIRSCHNER, M. W. Domineos and clocks: the union of two views of the cell cycle. **Science**, v. 246, p. 614-621, 1989.

NAITO, K.; TOYODA, Y. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 93, p.467-473, 1991.

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

ODOR, L. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. **J. Biophys Biochem.**, v. 7, p. 567-574, 1960.

OKOLSKI, A Size of the follicle versus oocyte maturation in the mare. PROC. 11TH INTERN. CONG. ANIM. REPROD. & AI., 1988. v. 13, p. 347.

OKOLSKI, A; BABUSIK, B.; TISCHNER, M.; LIETZ, W. Evaluation of mare oocyte collection methods and stallion sperm penetration of zona-free hamster ova. **J. Reprod. Fertil.**, supl: 35, p. 191-196, 1987.

OKOLSKI, A.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Maturation of oocytes from normal and atretic equine ovarian follicles as affected by steroid concentrations. **J. Reprod. Fert.**,v. 44, p. 385, 1991.

PALMER, E.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. **J. Reprod. Fertil.**, v. 44, p. 375-384, 1991.

PALMER, E.; DUCHAMP, G. CRIBIU, E. P.; MAHLA, R.; BOYAZOGLU, S.; BEZARD, J. Follicular fluid is not a compulsory carrier of the mare's oocyte at ovulation. **Equine Vet J**, supl: 35, p. 689-690, 1997.

PALMER, E.; HAJMELI, G.; DUCHAMP, G. Gonadotrophin treatments increase ovulation rate of passive, but not embryo production from mares. **Equine Vet. J.**, supl: 15, p. 99-102, 1993.

PALMER, E.; MAGISTRINI, M.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G. Gestation après fécondation *in vitro* dans l'espèce équine. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v. 310, p. 71-74, 1990

PARIS, J.; RICHTER, J. D. Maturation-specific polyadenilation and translation control: diversity of cytoplasmic polyadenylation elements, influence of poly(A) tail size, and formation of stable polyadenilation complexes. **Mol. Cell Biol.**, v.10, p.5634-5645, 1990.

PARRISH, J. J.; SUSKO- PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, p. 591-600, 1986.

PAYNTON, B. V.; BACHVAROVA, R. Changes in maternal RNAs during oocyte maturation. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, 1990. p. 25-34.

PEREIRA, J. M. L. B. **Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: influência do tempo, do LHs e FSHs**. 1997. 87p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; McKINNON, A O; SHIDELER, R. K.; VOSS, J. L. Management of the mare for maximum reproductive efficiency. In: **licsu Animal Reproduction Biotechnology Laboratory**,bulletin:5, 1989.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol. Cell Endocr.**, v. 145, p. 27-37, 1998.

PINYPUMMINTR, T.; BAVISTER, B. D. In vitro maturation/ in vitro fertilization bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture medium. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 736-742, 1991. (Abstract).

QUESNEL, H. Localizaton of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary. **J. Endocrinol.**, v. 136, p. 363-372, 1999.

RATH, D.; JOHNSON, L. A; WELCH, G. R.; NIEMANN, H. Successful gamete intrafallopian transfer (GIFT) in the porcine. **Theriogenology**, v. 41, p. 1173-1179, 1994.

RICHTER, J. D. Dynamics of Poly (A) addition and removal during develop, emt. In: HERSHEY, J. W. B.; MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N. **Translational Control**. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press,. 1996. p. 481-503.

RIEGER, D.; LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; POCAR, P.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocyte in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 112, p. 123-130, 1998.

ROBERTSON, J. E.; BAKER, R. D. Role of female Sex steroids as possible regulators of oocyte maturation. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 1969, p. 57.

ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL, G. E. Jr. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 1012-1016, 1996.

ROY, S. K.; GREENWALD, G. J.; Immunohistochemical localization of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. **Endocrinology**, v. 126, p. 1309-1317, 1990.

SAEKI, K.; HOSHI, M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. **Biol. Reprod.**, v. 44, p. 256-260, 1991.

SATHANANTHAN, A. H. Ultrastuctural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: Unique aspects of the human oocyte. **Microsc. Res. Tech.**, v. 27, p. 145-164, 1994.

SCHULTZ, R. M. Molecular aspects of mammalian oocyte growth and maturation. In: ROSSANT, J.; PEDERSEN, R.A **Experimental approaches to mammalian embryonic development**. London: Cambridge University Press, 1986, p. 195-237.

- SCOTT, T. J.; CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, C. F.; SCOGGIN, C. F. SQUIRES, E. L. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. **Theriogenology**, v. 55, p. 705-715, 2001.
- SHABPAREH, V.; SQUIRES, E. L.; JASKO, D. J. Collection and *in vitro* maturation of equine oocytes from excised mare ovaries. **Theriogenology**, v. 37, p. 296, 1992.
- SHABPAREH, V.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. et al. Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 40, p. 1161-1175, 1993.
- SHARARA, F. I.; NIEMANN, L. K. Identification and cellular localization of growth hormone receptor gene expression in the human ovary. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 79, p. 670-672, 1994.
- SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M. FUKUSHIMA, M.; IWASAKI, S.; HANADA, A. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 30, p. 489-95, 1988.
- SINGH, B.; ARMSTRONG, D. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 1370-75, 1997.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.
- SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biol. Reprod.** v. 39, p. 229-234, 1988.
- SIRARD, M. A., RICHARD, F., MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49 n.2, p. 483-497, 1998.
- SOSNOWSKI, J.; LECHNIAK, D.; BRZOZOWSKA, M.; SWINTONSKI, M. Cytogenetic analysis of horse oocytes matured *in vitro* for different periods of time. **Repr. Nutr. Dev.**, v. 37, p. 63-68, 1997.
- SOYAL, S. M.; AMLEH, A; DEAN, J. A germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. **Develop.**, v. 127, p. 4645-4655, 2000.
- SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **Vet. Clin. North Am: Equine Pract.**, v. 12, p. 31-45, 1996.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, p. 151-170, 2003.

ST. JOHNSTON, D. The intracellular localization of messenger RNAs. **Cell**, v. 81, p. 161-170, 1995.

SUN, F. Z.; MOOR, R. M. Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. **Development**, v. 111, p. 171-180, 1991.

SUTOVSKY, P.; FLECHON, J. E.; FLECHON, B. Dynamic changes of Gap Junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 1277-1287, 1993.

SZÖLLÖSI, D.; GERARD, M.; MÉNÉZO, Y.; THIBAUT, C. Permeability of the ovarian follicle; corona cell-oocyte relationship in mammals. **Ann. Biol. Anim. Biophys.**, v. 18, p. 511-521, 1978.

TAIEB, F.; THIBIER, C.; JESSUS, C. On cyclins oocytes and eggs. **Molec. Reprod. Develop.**, v. 48, p. 396-411, 1997.

TROUNSON, A; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction.**, v. 121, p. 51-75, 2001.

TSAFRIRI, A; ADASHI, E. The physiology of reproduction. In: **Local nonsteroidal regulators of ovarian function**. New York: Raven Press, 1994. cap. 15. p. 817-861.

TSAFIRI, A.; CHANNING, C. P. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v. 43, p. 149-152, 1975.

TSAFRIRI, A; LINDER, H. R.; ZOR, U.; LAMPRECHT, S. A *In vitro* induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E2. **J. Reprod. Fertil.**, v. 31, p. 39-50, 1972.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W. DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 1317-1324, 1998.

VAN DE LEEMPUT, E. E., VOS, P. L. A. M., ZEINSTRA, E. C., et al. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v. 52, p. 335-349, 1999.

VOGELSANG, M. M.; KRAEMER, D. C.; POTTER, G. D. et al. Fine structure of the follicular oocyte of the horse. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. 35, p. 157-167, 1987.

WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G. R.; BUNCH, T. D. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 48, p. 37-45, 1997.

WHITMORE, H. L.; WENTWORTH, B.C.; GINTHER, O. J. Circulating concentrations of luteinizing hormone during estrous cycle of mares as determined by radioimmunoassay. **Am. J. Vet. Res.**, v.34, p. 631-636, 1973.

WILLIAMSON, P.; MUNUYUA, S.; MARTIN, R.; PENHALE, W. J. Dynamics of the acute uterine response to infection endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. **J Reprod Fertil**, v.35, p. 317-325, 1987.

WILLIS, P.; CAUDLE, A B.; FAYRER-HOSKEN, R. A Equine oocyte *in vitro* maturation: influences of sera, time and hormones. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 30, p. 360-368, 1991.

WILLIS, P.; CAUDLE, A B.; FAYRER-HOSKEN, R. A Fine structure of equine oocytes matured *in vitro* for 15 hours. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 37, p. 87-92, 1994.

WITTMACK, F. M.; KREGER, D. O; BLASCO, L.; TURECK, R. W.; MASTROIANNI, L.; LESSEY, B. A. Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage and embryo quality in *in vitro* fertilization cycles: a 6 year data collection. **Fertil. Steril.**, v. 62, p. 1205-1210, 1994.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W.B.; YANG, X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 253-259, 1997.

WYNN, P.; PICTON, H. M.; KRAPEZ, J. A; RUTHERFORD, A J.; BALEN, A H.; GOSDEN, R. G. Pretreatment with follicle size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage and embryo quality in *in vitro* fertilization cycles: a 6 year data collection. **Fertil. Steril.**, v. 13, p. 3132-3138, 1998.

XIA, P.; TEKPEY, F. R.; ARMSTRONG, D. T. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 38, p. 373-379, 1994.

- XU, K. P.; GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. Pregnancy resulting from cattle oocyte matured and fertilized *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 81, p. 501-504, 1987.
- YAMAUCHI, N.; SASADA, H.; SOLOY, E.; DOMINKO, T.; KIKUCHI, K.; NAGAI, T. Effects of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes. **Theriogenology**, 52: 153-162, 1999.
- YANG, N. S.; LU, K. H.; GORDON, I. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology**, v. 33, p. 352, 1990. Abstract.
- YOSHIDA, M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, H.; BAMBA, K.; KOJIMA, Y. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 92, p. 481-488, 1992.
- YOSHIMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; KOYAMA, N.; IWASHITA, M.; ADACHI, T.; TAKEDA, Y. Effects of growth hormone on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis. **Fertil. Steril.**, v. 59, p. 917-923, 1993.
- YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYER-HOSKEN, R. A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Gamete. Res.**, v. 23, p. 189-201, 1989.
- ZAMBONI, L.; MASTROIANNI, Jr. L. Electron microscopic studies on rabbit ova II. The penetrated tubal ovum. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 14, p. 118-132, 1966.
- ZHANG, J. J.; BOYLE, M. S.; ALLEN, W. R.; GALLI, C. Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. **Equine Vet. J.**, suppl: 8, p. 101-104, 1989.
- ZHANG, J. J.; MUZS, L. Z.; BOYLE, M. S. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 26, p. 361-365, 1990.
- ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus inclosed bovine oocytes matured *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 46, suppl: 1, p. 117, 1992.
- ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell inclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormonal. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 815-820, 1993.