

Equínos: oogênese, foliculogênese e maturação

Equine oocytes: oogenesis, folliculogenesis and maturation

Bruna da Rosa Curcio¹, Priscila Marques Moura de Leon², Friedrich Frey Junior², Carlos Eduardo Wayne Nogueira², João Carlos Deschamps^{1,2,3}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

³Correspondência: deschamp@ufpel.edu.br

Resumo

O objetivo desta revisão foi abordar os processos de diferenciação, desenvolvimento e maturação *in vivo* e *in vitro* de oócitos em eqüinos. São enfatizados os aspectos relacionados à oogênese e foliculogênese, bem como o processo de maturação *in vivo* dos oócitos eqüinos até o momento da ovulação. Também é descrita a evolução dos estudos sobre maturação *in vitro* (MIV). O entendimento das particularidades na fisiologia, adição de hormônios, fatores de crescimento específicos nos meios de cultivo proporcionou avanços na MIV, porém mais estudos são necessários para incrementar de forma eficiente a produção *in vitro* de embriões na espécie eqüina.

Palavras-chave: eqüino, oogênese, foliculogênese, maturação de oócitos, MIV.

Abstract

The objective of this review was to describe the process of differentiation, development and in vivo and in vitro maturation of equine oocytes. Therefore, aspects related with oogenesis, folliculogenesis, and the process of in vivo maturation of equine oocytes until ovulation and also the evolution of in vitro maturation (IVM) researches are emphasized. Understanding physiologic mechanism, the addiction of hormones and growth factors in culture medium allowed advances of equine IVM. However, further studies are required to improve the techniques for in vitro production of equine embryos.

Keywords: equine, oogenesis, folliculogenesis, oocyte maturation, IVM.

Introdução

Os mecanismos fundamentais responsáveis pela diferenciação dos oócitos primordiais, pelo desenvolvimento folicular e desencadeamento da fase final da maturação oocitária durante o estro até o momento da ovulação são ainda pouco conhecidos na espécie eqüina (Pierson, 1993; Squires *et al.*, 2003). O entendimento desses mecanismos é realizado, basicamente, relacionando as informações relatadas de outras espécies domésticas, principalmente bovina e ovina.

O conhecimento do processo de formação dos oócitos, ativação, desenvolvimento folicular e maturação oocitária *in vivo* é essencial para a criação de técnicas que maximizam o potencial reprodutivo das espécies domésticas e das em extinção.

Os índices de maturação *in vitro* em eqüinos são baixos, quando comparados com outras espécies domésticas (Dell'Aquila *et al.*, 1997; Hinrichs e Williams, 1997; Carneiro *et al.*, 2001; Squires *et al.*, 2003). Os fatores que podem estar envolvidos com esses baixos índices estão possivelmente relacionados à dificuldade na colheita dos oócitos, determinação do tempo de incubação e meio de cultivo utilizado, avaliação do uso de co-cultivo com células somáticas, adição de hormônios e fatores de crescimento, além do pouco conhecimento sobre os fatores que desencadeiam a meiose *in vivo* na espécie (Curcio, 2005).

O objetivo da presente revisão foi abordar os processos de diferenciação, desenvolvimento e maturação *in vivo* de oócitos, assim como relatar os avanços nos estudos sobre maturação *in vitro* (MIV) de oócitos na espécie eqüina.

Oogênese

A oogênese ocorre durante a vida fetal, sem acontecer, em geral, aumento do número de oócitos após o nascimento. As células germinativas primordiais se originam do endoderma do saco vitelino primitivo, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônias e começam a multiplicar-se pelas divisões mitóticas (Van Den Hurk *et al.*, 1997).

Durante o desenvolvimento fetal, a proliferação de células germinativas primordiais ocorre por mitose no córtex ovariano. A multiplicação das oogônias se inicia no 50º dia de gestação até, aproximadamente, o 150º-

160° dia. As oogônias iniciam o processo de divisão meiótica nos 75°-80° dias de gestação até o 160° dia, transformando-se em oócitos primários, os quais permanecem na fase de diplóteno da prófase I, também denominada dictióteno ou vesícula germinativa (VG) da primeira prófase meiótica, até o início da puberdade (Pierson, 1993; Picton, 2001). Durante a vida fetal, ocorre atresia substancial de oócitos, e a maior incidência de folículos atrésicos é encontrada aproximadamente no 100° dia de gestação (Pierson, 1993).

A retomada das divisões meióticas ocorre na puberdade durante o processo ovulatório, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) (Dekel *et al.*, 1988). A maturação nuclear do oócito evolui até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (oócito secundário) momentos antes da ovulação.

Foliculogênese

A foliculogênese é o processo pelo qual os folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para ovulação. O número de folículos ovarianos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito pequeno, estima-se que aproximadamente 99% sofram atresia (Webb *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de folículos pré-antrais pode ser dividido em três estágios: ativação de folículos primordiais, transição de folículo primário para secundário e desenvolvimento de folículos secundários até o estágio pré-antral (Fortune, 2003). Folículos primários e secundários são referidos coletivamente como folículos pré-antrais (Pierson, 1993).

Os mecanismos que regulam a ativação, o crescimento e a diferenciação de folículos pré-antrais são pouco conhecidos. Entretanto, acumulam-se evidências de que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais requerem a expressão de vários fatores e receptores. Em particular, a família dos “fatores de crescimento transformantes β ” (TGF- β) tem-se mostrado potente regulador da proliferação e diferenciação celular, nas diferentes espécies (Elvin *et al.*, 2000). Além desses fatores, existem também comprovações sobre a importância das gonadotrofinas, hormônio do crescimento (GH), esteróides e andrógenos no desenvolvimento de folículos pré-antrais e primordiais (Hartshorne *et al.*, 1994; Vendola *et al.*, 1998; Bachelot *et al.*, 2002; Zaczek *et al.*, 2002).

Em éguas, os folículos ovarianos desenvolvem um antro que atinge 300 μ m de diâmetro, o qual é preenchido por um fluido viscoso composto por hormônios esteróides. Junto a esse processo, ocorre a formação da camada da teca folicular ao redor da granulosa. Ocorre também nova proliferação das células da granulosa, as quais se organizam em várias camadas ao redor do oócito, formando o “*cumulus oophorus*”. Todos esses eventos marcam a transição de folículo secundário para terciário, o qual inicia novo desenvolvimento até ser eleito à ovulação (Hafez, 1995).

Em espécies monovulatórias como a equina, usualmente, um único folículo emergirá da onda de crescimento folicular e chegará a folículo dominante. Uma elevação dos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) plasmático promove o recrutamento de folículos; quando as concentrações de FSH iniciam seu declínio, os dois folículos maiores crescem paralelamente (fase paralela). Ambos os folículos secretam inibina, causando progressivo declínio da concentração de FSH, necessário para seus próprios crescimentos (Ginther, 2000).

O futuro folículo dominante é apto a utilizar baixas concentrações de FSH para seu crescimento e desenvolvimento, devido ao aumento na expressão de receptores para FSH (Webb *et al.*, 1999). Em bovinos e, aparentemente, em equinos, a expressão de receptores para LH é maior no “futuro” folículo dominante do que nos outros folículos antes da fase de divergência. Essa fase é caracterizada pela seleção de um folículo dominante, de 22,5mm, em geral com diâmetro 3mm superior ao do segundo maior folículo (Ginther *et al.*, 2003). Além disso, existe a participação decisiva de fatores de crescimento produzidos localmente, no processo de seleção do folículo dominante (Monniaux *et al.*, 1997). Os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e suas proteínas de ligação (IGFBPs) são considerados os mais importantes nessa fase (Ginther *et al.*, 2004).

Em resumo, pode-se afirmar que o desenvolvimento folicular é um processo que envolve uma complexa série de eventos que têm o papel de induzir o crescimento e a regressão de folículos no ovário da fêmea. Os sinais responsáveis pela ativação de folículos primordiais e os mecanismos reguladores desse desenvolvimento ainda não foram completamente esclarecidos. Os eventos que ocorrem durante a fase final de crescimento folicular podem ser divididos em três fases: recrutamento e seleção (crescimento de vários folículos antrais), dominância (ocorre crescimento maior de um único folículo) e ovulação ou atresia (ovulação do folículo dominante e atresia dos demais). A fase final é controlada basicamente pelas gonadotrofinas, além de sofrer influência de fatores locais.

Maturação *in vivo* de oócitos

O processo de maturação oocitária consiste em uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos que preparam o oócito para a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial (Fissore *et al.*, 2002).

Durante os sucessivos ciclos estrais, ocorre estímulo para o reinício da meiose dos oócitos ovarianos, devido à presença do pico ovulatório de LH nos mamíferos (Pierson, 1993). Na espécie equina, as condições para a maturação *in vivo* do oócito diferem das outras espécies domésticas; não há pico de liberação de LH

ovulatório e sim um aumento progressivo durante os dias de estro. O fator que desencadeia a retomada da maturação oocitária, em equínos, ainda não foi esclarecido (Hinrichs *et al.*, 1993a; Goudet *et al.*, 1998; Dell'Aquila *et al.*, 2004). Também não é conhecido o tempo de duração do processo de maturação *in vivo* (Hinrichs *et al.*, 1993a). Entretanto, oócitos colhidos de folículos pré-ovulatórios, 36 horas após a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG), estão maduros (King *et al.*, 1987). Considera-se que o tempo para maturação *in vivo* é próximo de 36 horas e que ocorra sob a ação de gonadotrofinas (Fissore *et al.*, 2002).

A ocorrência de maturação meiótica é mediada por mudanças nos padrões de fosforilação de várias proteínas celulares (Dekel, 1996). Um componente importante é o Fator Promotor da Maturação (MPF) (Goudet *et al.*, 1998), o qual é descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (Nurse, 1990). O MPF é ativado quando ocorre a associação das duas subunidades, p34cdc2 e ciclina B, e da subsequente alteração do estado de tri-fosforilação da subunidade p34cdc2 (Nurse, 1990). Essa ativação induz à quebra da vesícula germinativa (QVG) e promove a progressão da meiose até metáfase II (MII) (Dekel, 1996).

A Proteína Quinase Ativadora da Maturação (MAPK) é uma serina-treonina quinase, ativada pela sua fosforilação, muito importante na regulação da transição da meiose I para a meiose II e, principalmente, na manutenção do estágio de MII (Sobajima *et al.*, 1993; Fissore *et al.*, 2002). Em mamíferos, a ativação da MAPK nas células do *cumulus* é necessária para ocorrer a indução da retomada da meiose por ação de gonadotrofinas, porém a ativação da MAPK não é necessária nos casos de retomada espontânea da meiose. Após a QVG, a MAPK está envolvida na regulação da organização dos microtúbulos e na construção do fuso mitótico (Fan e Sun, 2004). Goudet *et al.* (1998) demonstraram a presença de MAPK e das duas subunidades de MPF em oócitos equínos.

Avaliando-se a maturação nuclear, a retomada da maturação meiótica se manifesta pela QVG, que consiste na condensação da cromatina e na dissolução da membrana nuclear. Ocorre duplicação dos centríolos, e os cromossomos em pares diplóides, que se encontram livres no citoplasma, migram para a região equatorial (metáfase I - MI). O oócito primário sofre divisão meiótica, e duas células filhas são formadas, uma delas contém a maior parte do citoplasma e constitui o oócito propriamente dito. A outra, muito menor, é expulsa para o espaço perivitelino, sendo denominada corpúsculo polar, que, além de cromossomos, possui uma variedade de organelas, incluindo mitocôndrias, ribossomos e grânulos corticais. Nesse momento, o oócito é considerado secundário, e os cromossomos se alinham no centro do fuso, caracterizando o estágio de MII. Inicia-se, então, o segundo período de repouso da divisão meiótica, que só poderá ser completada com a penetração espermática, a extrusão do segundo corpúsculo polar e a finalização da meiose (Sirard *et al.*, 1992).

Os oócitos devem apresentar competência meiótica para que possam reiniciar e completar a maturação nuclear. Aparentemente, a aquisição dessa capacidade ocorre em duas etapas: 1) os oócitos em crescimento têm habilidade em romper a membrana nuclear e evoluir até o estágio de MI; 2) os oócitos progridem até a fase de MII, completando a maturação nuclear (Downs, 1993).

A maturação citoplasmática é caracterizada por mudanças no formato e na distribuição das organelas celulares. Ocorrem alterações qualitativas na síntese protéica do oócito, que, além de auxiliarem no processo de retomada da meiose, previnem a polispermia durante a fecundação (Fissore *et al.*, 2002).

Além dos eventos fisiológicos que promovem a maturação oocitária *in vivo*, a retomada da meiose pode também ocorrer como consequência da atresia, quando a qualidade do folículo e o controle meiótico estão comprometidos (DOWNS, 1993). Quando os oócitos são retirados de folículos terciários (retirada de fatores inibitórios) e cultivados *in vitro*, a maturação nuclear ocorre espontaneamente (Sirard e Coenen, 1993).

Maturação de oócitos *in vitro*

As taxas de MIV em equínos são baixas, quando comparadas com as de outras espécies; geralmente obtêm-se entre 35 e 80% de oócitos em MII (Dell'Aquila *et al.*, 1997; Hinrichs e Williams, 1997; Squires *et al.*, 2003), enquanto em bovinos esses índices chegam a 97% (Shiroya *et al.*, 1988).

O índice de recuperação de oócitos na espécie equina é inferior ao obtido em outras espécies de produção (Shabpareh *et al.*, 1993). A presença do *cumulus oophorus* mais aderido à parede do folículo do que em outras espécies e a sua localização são fatores diretamente relacionados aos baixos índices de recuperação de oócitos (Brück *et al.*, 1999; Hawley *et al.*, 1995).

A colheita de oócitos *in vivo* é realizada por aspiração (150mmHg) e lavagem dos folículos. Em um estudo retrospectivo com 86 éguas, de 2000 a 2004, Carnevale *et al.* (2005) descrevem índice de recuperação oocitária de 77% (548 oócitos de 710 folículos). A falta de um protocolo de superovulação eficiente na espécie equina contribui para o baixo índice de recuperação oocitária. A média de oócitos recuperados/égua por estação reprodutiva é de 3,7 (Carnevale *et al.*, 2005).

Os métodos para obter oócitos equínos *in vitro* são: aspiração folicular, “fatiamento” do ovário (*slicing*) (Choi *et al.*, 1993) e curetagem da parede folicular (*scraping*) (Hinrichs *et al.*, 1993a).

A média de recuperação de oócitos por aspiração do fluido folicular é de 0,8 a 1,75 oócitos/ovário (Choi *et al.*, 1993; Pereira, 1997). A associação do *slicing*, após a aspiração dos folículos presentes na superfície do ovário, aumenta a taxa de recuperação para 5,98 oócitos/ovário (Choi *et al.*, 1993). Utilizando *scraping* da parede dos folículos, os índices de recuperação estão entre 2,15 e 4,1 oócitos/ovário (Hinrichs *et al.*, 1993a; Hinrichs e Williams,

1997; Dell'Aquila *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002a). Boff *et al.* (2004) utilizando o *scraping* da camada granulosa, obteve média de 2,49 oócitos colhidos por ovário e índice de 71% de recuperação de oócitos.

Em relação ao tempo decorrido desde a colheita dos ovários até o cultivo *in vitro* dos oócitos, foi comprovado que intervalo de 3 a 15 horas não demonstra diferença nos índices de maturação nuclear (Shabpareh *et al.*, 1993; Del Campo *et al.*, 1995). O armazenamento dos ovários *overnight* (15-18 horas) à temperatura ambiente (25-31°C) ou resfriado a 4°C reduziu as taxas de maturação em relação ao controle (Love *et al.*, 2003). Na maioria dos trabalhos, o tempo desde a colheita dos ovários até o cultivo *in vitro* é entre 3 e 5 horas.

Brück *et al.* (1996) e Goudet *et al.* (1997) demonstraram não haver diferença no índice de maturação de oócitos eqüinos colhidos durante a fase folicular ou luteínica do ciclo estral.

Del Campo *et al.* (1995) e Brück *et al.* (1996) constataram que oócitos provenientes de folículos ≤ 10 mm de diâmetro possuem menor capacidade para atingir a maturação nuclear do que os provenientes de folículos maiores. No momento da colheita, o estágio de maturação dos oócitos provenientes de folículos com diâmetro entre 10 e 30mm é basicamente VG (60%) e QVG (36%) (Del Campo *et al.*, 1995), sendo que o índice de MII é baixo, não atingindo 5% (Brück *et al.*, 1996). Oócitos no estágio de VG, especialmente com cromatina condensada, e QVG são considerados ideais para os estudos de MIV, por estarem aptos à retomada da meiose.

Existem grandes variações quanto aos padrões morfológicos dos oócitos entre as espécies. Oócitos de camundongos apresentam ooplasma claro e quase ausente de granulações, enquanto em eqüinos, suínos e caninos observa-se ooplasma escuro e com granulações. Essas podem se apresentar de forma heterogênea, devido à quantidade e à distribuição dos lipídeos citoplasmáticos (Carneiro *et al.*, 2002).

Segundo Fernandes (2004), o oócito eqüino pode ter seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pelas características do complexo *cumulus oophorus* (CCO). Morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo, de coloração marrom com granulações finas e estar completamente envolvidos por uma camada de células do *cumulus* dispostas de forma compacta (Figura 1A). Porém, Hinrichs e Williams (1997) comprovaram que oócitos com *cumulus* expandido (Figura 1B) e ooplasma com granulações de coloração irregular obtêm maior índice de maturação do que oócitos compactos, os quais possuem ooplasma homogêneo.

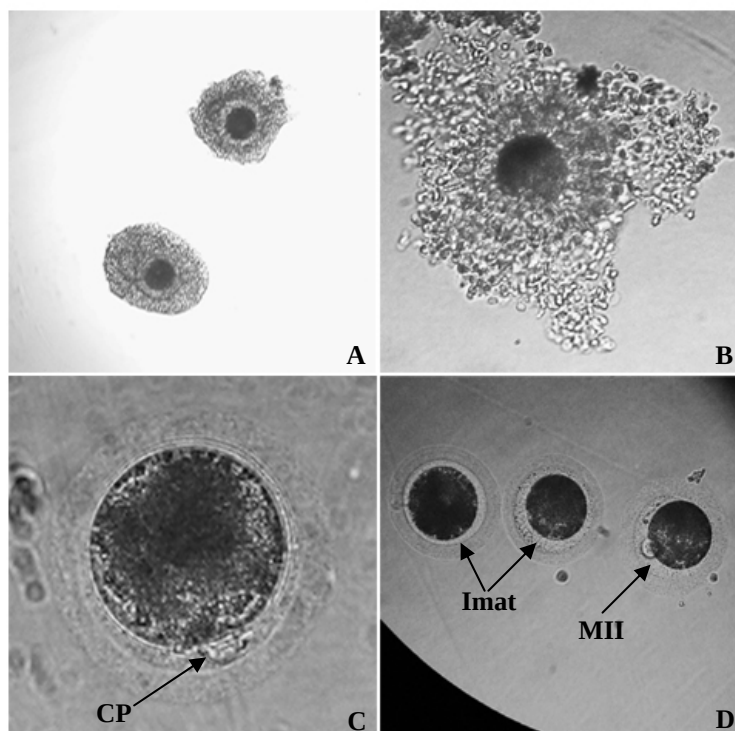


Figura 1. Oócitos eqüinos: **A:** Oócitos com *cumulus oophorus* compacto, após a coleta (Aumento 40X). **B:** Oócitos com *cumulus oophorus* expandido, após a coleta (Aumento 100X). **C:** Oócito em Metáfase II, sendo observada extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) (Aumento 400X). **D:** Oócitos desnudos, após incubação de 40 h em 5% CO₂, observa-se dois oócitos imaturos (Imat) e um oócito em Metáfase II (MII) (Aumento 100X).

Estágios iniciais de atresia parecem estimular a competência do oócito ao desenvolvimento *in vitro* em bovinos (Blondin e Sirard, 1995) e eqüinos (Hinrichs e Williams, 1997). A expansão do *cumulus* de oócitos eqüinos também está relacionada à apoptose das células da granulosa e não possui relação com o tamanho dos folículos. No momento da colheita, as proporções de oócitos com *cumulus* compacto e expandido que

encontram-se em estágio de VG, portanto imaturos, são similares (Hinrichs, 1997). Oócitos com *cumulus* expandidos de folículos atrésicos possuem cromatina compacta e demonstram maior competência meiótica em relação aos oócitos com *cumulus* compacto (Hinrichs e Williams, 1997), porém não possuem melhores índices de ativação após injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) do que oócitos com *cumulus* compacto (Dell'Aquila *et al.*, 2003).

Avaliando-se a maturação nuclear por microscopia óptica ou de fluorescência, os oócitos podem ser classificados em: VG (núcleo esférico localizado central ou periféricamente no ooplasma), QVG (núcleo com carioteca irregular ao redor da cromatina condensada ou dispersa), MI (cromossomos arranjados na placa metafásica, localizada na periferia do ooplasma) e MII (cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e corpúsculo polar no espaço perivitelínico) (Hinrichs *et al.*, 1993b; Grondahl *et al.*, 1995). Nas Fig. 1C e 1D, podem-se observar oócitos em MII por microscopia óptica, demonstrando extrusão do primeiro corpúsculo polar.

Durante o processo de maturação citoplasmática, os oócitos sofrem alterações bioquímicas e estruturais. Observa-se a redistribuição de organelas, como os grânulos corticais (GC), mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, que auxiliam a ocorrência da exocitose dos GC desencadeada pela fecundação (Dulcibella *et al.*, 1993).

A maturação citoplasmática em equínos pode ser avaliada pela distribuição das organelas por microscopia eletrônica (Hyttel *et al.*, 1997; Pereira, 1997; Landim-Alvarenga *et al.*, 2002; Fernandes, 2004), migração dos grânulos corticais (Cran, 1989; Neumann *et al.*, 1995; Goudet *et al.*, 1997; Carneiro *et al.*, 2002; Curcio, 2005), clivagem partenogenética (Carneiro *et al.*, 2001) ou técnicas de fecundação (Carnevale, 1996).

Uma grande variedade de meios de cultivo vem sendo utilizada para avaliar o efeito de diferentes componentes do soro, macromoléculas, hormônios, fatores de crescimento e adição de células somáticas na MIV em equínos (Carneiro, 2002).

Shabpareh *et al.* (1993) compararam o meio de cultivo de tecidos (TCM) e o Ham F10 na maturação de oócitos equínos e obtiveram maior índice de maturação com TCM em 36 horas de cultivo. A grande maioria das pesquisas de MIV em equínos utiliza o TCM como meio base, adicionando diferentes complementos, sendo a escolha para o desenvolvimento de trabalhos de Curcio (2005).

Willis *et al.* (1991) constataram uma redução significativa na maturação nuclear dos oócitos em meio suplementado com albumina sérica bovina (BSA), quando comparado à utilização de outras fontes protéicas. Entretanto, devido às preocupações sanitárias, a utilização de BSA como suplemento protéico é amplamente difundida na MIV de oócitos equínos, sendo descrita por Dell'Aquila *et al.* (2004), Fernandes (2004) e Curcio (2005). A importância das células somáticas durante o processo de maturação *in vivo* é clara e tem sido positiva nos sistemas de cultivo para MIV em bovinos (Squires, 1996). Alm e Torner (1994) afirmam ser positivo o co-cultivo de oócitos equínos com células da granulosa na maturação nuclear. Entretanto, estudos utilizando células da teca em co-cultivo com oócitos equínos com *cumulus* compacto não encontraram diferença na maturação nuclear ou citoplasmática (Choi *et al.*, 2002b).

Hinrichs *et al.* (1993a) indicaram que o tempo de permanência do oócito equino em cultivo deve ser maior que o das outras espécies. O tempo médio necessário para a maioria dos oócitos equínos encontrarem-se maduros oscila entre 28-36 horas (Carneiro, 2002). Foi comprovado que a adição do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) ao meio de cultivo diminui o tempo de progressão meiótica de oócitos equínos, sugerindo que o tempo necessário de maturação está intimamente relacionado ao sistema de maturação (Carneiro *et al.*, 2001; Carneiro, 2002).

Até o presente momento, as razões para a falha dos oócitos equínos em completar a meiose *in vitro* não foram determinadas, porém podem estar relacionadas às alterações nas reações bioquímicas envolvidas no processo meiótico. A constatação de que a MAPK permanece na forma não fosforilada, supostamente inativa, em oócitos incapazes de completar a meiose *in vitro*, fortalece essa teoria (Goudet *et al.*, 1998).

A maioria dos protocolos para MIV em equínos utiliza a adição de hormônios gonadotróficos e estradiol. Porém, existem autores que afirmam que a presença de FSH e LH não acarreta efeito na proporção de oócitos que atingem MII (Willis *et al.*, 1991; Dell'Aquila *et al.*, 2004).

A adição de outros hormônios e fatores de crescimento tem sido amplamente estudada, com o objetivo de melhorar os índices de MIV em equínos. O EGF demonstrou aumento na maturação de oócitos equínos (Lorenzo *et al.*, 2001), regulando a maturação oocitária, estimulando a QVG e induzindo a expansão das células do *cumulus oophorus* (Buccione *et al.*, 1990). Carneiro *et al.* (2001) determinaram que o IGF-I incrementa os índices de maturação nuclear em equínos, sendo a concentração indicada de 200ng/mL de IGF-I. Posteriormente, foi determinado que a adição de IGF-I ao meio induz maior acúmulo de MAPK no citoplasma, o que, por sua vez, refletiu maior desenvolvimento embrionário após a partenogênese de oócitos equínos (Li *et al.*, 2004). Marchal *et al.* (2003) utilizaram 500ng/mL de hormônio do crescimento equino (eGH) e obtiveram aumento no índice de maturação nuclear.

Em pesquisa desenvolvida por Curcio (2005), a associação de IGF-I e eGH não aumentou de forma significativa o índice de MII, porém mais estudos são necessários para comparação das concentrações ideais na associação desses hormônios.

Até o presente momento, as razões para a falha dos oócitos equínos em completar a meiose *in vitro* não

foram determinadas, porém podem estar relacionadas a alterações nas reações bioquímicas envolvidas no processo meiótico. Muitas dúvidas e discussões permanecem sobre a seleção e viabilidade dos CCO, sendo necessária a padronização de sistemas de cultivo específicos para cada tipo de oócito. O entendimento das particularidades da fisiologia, adição de hormônios e fatores de crescimento específicos nos meios de cultivo proporcionaram avanços na MIV em equinos. Entretanto, mais estudos são necessários para incrementar de forma eficiente a produção *in vitro* de embriões na espécie equina.

Referências

- Alm H, Torner H. *In vitro* maturation of horse oocytes. *Theriogenology*, v.42, p.345, 1994 (abstract).
- Bachelot A, Monget P, Imbert-Bollere P, Coshigano K, Kopchick JJ, Kelly PA, Binart N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology*, v.143, p.4104–4112, 2002.
- Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.41, p.54–62, 1995.
- Boff ALN, Curcio BR, Leon PMM, Xavier F, Rambo G, Heineck M, Fabiane C, Nogueira CEW, Deschamps JC. Coleta de oócitos equinos por curetagem da parede dos folículos. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPel, 13, 2004, Pelotas, RS. *Anais ... Pelotas: Editora e Gráfica UFPel*, 2004. Resumo CA 01188.
- Brück I, Greve T, Hyttel P. Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare. *Anat Embryol*, v.199, p.21–28, 1999.
- 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.
- Buccione R, Schroeder A, Eppig J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*, v.43, p.543–547, 1990.
- Carneiro GF. Maturação *in vitro* de oócitos equinos. *Ciênc Tecnol Vet*, v.2, p.5–10, 2002.
- Carneiro GF, Liu IK, Hyde D, Anderson GB, Lorenzo PL, Ball BA. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev*, v.63, p.451–458, 2002.
- Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I. Influence of insulin-like growth factor-I and 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.
- Carnevale EM. Gamete intrafallopian transfer. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.47–60, 1996.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, Stokes JE, Squires EL. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, v.64, p.519–527, 2005.
- Choi YH, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and the slicing of ovaries. *Theriogenology*, v.40, p.959–966, 1993.
- Choi YH, Love CC, Love LB, Varner DD, Brinsko S, Hinrichs K. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*, v.123, p.455–465, 2002a.
- Choi YH, Shin T, Love CC, Johnson C, Varner DD, Westhusin ME, Hinrichs K. Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence and activation rates after nuclear transfer. *Theriogenology*, v.57, p.1005–1011, 2002b.
- Cran DG. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Fertil Suppl*, v.38, p.49–62, 1989.
- Curcio BR. Maturação e vitrificação de oócitos equinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2005.
- Dekel N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev Reprod*, v.1, p.82–88, 1996.
- Dekel N, Gakliani 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.
- Del Campo MR, Donoso X, Parrish JJ, Ginther, OJ. Morphology and location of attached follicular cumulus-oocyte complexes in horses, cattle and llamas. *Theriogenology*, v.43, p.533–542, 1995.
- Dell'Aquila ME, Albrizio M, Maritato F, Minoia P, Hinrichs K. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. *Biol Reprod*, v.68, p.2065–2072, 2003.
- Dell'Aquila ME, Caillaud M, Maritato F, Martoriati A, Gerard N, Aiudi G, Minoia P, Goudet G. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro* in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. Disponível em <<http://www.rbj.com/content/2/1/44>> Acesso em 22 de nov 2004.
- Dell'aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F. Intracytoplasmic

- sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro*-matures equine oocytes. *Theriogenology*, v.47, p.1139-1156, 1997.
- Dell'Aquila ME, Masterson M, Maritato F, Hinrichs K.** Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after ICSI of equine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.79-88, 2001.
- Downs SM.** Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, v.39, p.65-79, 1993.
- Ducibella T, Kurasawa S, Duffy P, Kopf GS, Schultz RM.** Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and *Zona Pellucida* modifications induced by Inositol 1,4,5-Trisphosphate and an activator of protein Kinase C'. *Biol Reprod*, v.48, p.1251-1257, 1993.
- Elvin JA, Yan C, Matzuk MM.** Oocyte-expressed TGF-beta superfamily member in female fertility. *Mol Cell Endocrinol*, v.159, p.1-5, 2000.
- Fan H, Sun G.** Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*, v.70, p.535-547, 2004.
- Fernandes CB.** *Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre meios TCM 199, SOFaa e HTF: BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio do crescimento eqüino por meio da transferência de ovócito.* 2004. 129f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Pós-graduação em Medicina Veterinária, UNESP.
- Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J.** Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*, v.124, p.745-754, 2002.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.
- Ginther OJ.** Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.61-79, 2000.
- Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR.** Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.239-257, 2003.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K.** *In vivo* effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor I on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol Reprod*, v.70, p.99-105, 2004.
- Goudet G, Belin F, Bezard J, Gerard 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, 1998.
- 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, 1997.
- Grondahl C, Host T, Brück 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.
- Hafez ESE.** Anatomia da reprodução feminina. In: Hafez ESE. *Reprodução animal*. São Paulo: Ed. Manole, 1995. p.21-58.
- Hartshorne GM, Sargent IL, Barlow DH.** Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. *Hum Reprod*, v.9, p.1003-1012, 1994.
- Hawley LR, Endres AC, Hinrichs K.** Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, v.1, p.243-252, 1995.
- Hinrichs K.** Cumulus expansion, chromatin configuration and meiotic competence in horse oocytes: A new hypothesis. *Equine Vet J Suppl*, n.25, p.43-46, 1997.
- Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG.** *In vitro* maturation of horse oocytes characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod*, v.48, p.363-370, 1993a.
- Hinrichs K, Schmidt AL, Selgrath JP.** *In vitro* maturation of horse oocytes characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Equine Vet J Suppl*, n.15, p.60-63, 1993b.
- Hinrichs K, Williams KA.** Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod*, v.57, p.377-384, 1997.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greeve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.
- King WA, Bezard J, Bousquet D, Palmer E, Betteridge KJ.** The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares. *Genome*, v.29, p.679-682, 1987.
- Landim-Alvarenga FC, Rubin MIB, Silva CAM, Ponchirolli CB, Alves DF, Maclellan LJ.** Effects of culture media on *in vitro* maturation of equine oocytes. *Theriogenology*, v.57, p.725, 2002. (abstract).
- Li XI, Dai Y, Allen WR.** Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes *in vitro* and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. *Biol Reprod*, v.71, p.1391-1396, 2004.

- Lorenzo PL, Liu IK, Illera JC, Picazo RA, Carneiro GF, Illera MJ, Conley AJ, Enders AC, Illera M.** Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. *J Physiol Biochem*, v.57, p.15-22, 2001.
- Love LB, Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K.** Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology*, v.59, p.765-774, 2003.
- Marchal R, 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, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol Reprod*, v.69, p.1013-1022, 2003.
- Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C.** Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*, v.47, p.3-12, 1997.
- Neumann H, Alm H, Schnurrbusch U, Torner H, Greising T, Kanitz W.** The ultrastructure of equine oocytes before and after *in vitro* maturation. *Reprod Dom Anim*, v.30, p.428, 1995. (abstract).
- Nurse P.** Universal control mechanisms regulation onset of M-phase. *Nature*, v.334, p.505-508, 1990.
- Pereira JM.** *Maturação in vitro de oócitos equinos: Influência do tempo, LH e FSH.* 1997. 89f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1997.
- Picton HM.** Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, v.55, p.193-210, 2001.
- Pierson RA.** Folliculogenesis and ovulation. In: McKinnon AO, Voss JL. (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.161-171.
- Shabpareh V, Squire EL, Seidel GE, Jasko DJ.** Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, v.40, p.1161-1175, 1993.
- 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.489-496, 1988.
- Sirard MA, Coenen K.** The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotics resumption. *Theriogenology*, v.40, p.933-942, 1993.
- Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S.** Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, v.37, p.39-57, 1992.
- Sobajima T, Aoki F, Kohmoto K.** Activation of mitogenactivated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *J Reprod Fertil*, v.97, p.389-394, 1993.
- Squires EL.** Maturation and fertilization of equine oocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.31-45, 1996.
- Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE.** Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v.59, p.151-170, 2003.
- Van Den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF.** *In vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 1997.
- Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA.** Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest*, v.101, p.2622-2629, 1998.
- Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG.** Molecular mechanisms regulation follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Suppl*, n.54, p.33-48, 1999.
- Willis P, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA.** Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of sera, time and hormones. *Mol Reprod Dev*, v.30, p.360-368, 1991.
- Zaczek D, Hammond J, Suen L, Wandji S, Service D, Bartke A, Chandrashekar V, Coschigano K, Kopchick J.** Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Biol Reprod*, v.67, p.1115-1124, 2002.