



## Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos *Systems in vitro development of immature oocytes of mammals*

R.N. Chaves<sup>1</sup>, A.B.G. Duarte, M.H.T. Matos, J.R. Figueiredo

Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Foliculos Pré-Antrais (LAMOFOPA),  
Universidade Estadual do Ceará - UECE, 60740-000, Fortaleza, Ceará.

<sup>1</sup>Correspondência: mcvet@gmail.com

### Resumo

O ovário mamífero possui um grande estoque de foliculos primordiais, que é uma fonte potencial de oócitos para a produção *in vitro* de embriões. Sendo assim, o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que explorem o grande número de oócitos imaturos oriundos de foliculos pré-antrais de ovários mamíferos torna-se importante para maximizar o potencial reprodutivo das fêmeas. A presente revisão aborda os aspectos relacionados aos sistemas de cultivo *in vitro* para desenvolvimento de oócitos imaturos oriundos de foliculos pré-antrais, bem como às técnicas para analisar sua eficiência.

**Palavras-chave:** competência meiótica, crescimento folicular, oócito.

### Abstract

*The mammalian ovary has a large population of primordial follicles, which is a potential source of oocytes useful for embryo in vitro production. Due to this potential, the development of in vitro culture systems to exploit the large number of immature oocytes from the preantral follicles in the mammalian ovary becomes very important to maximize the female reproductive potential. The present review approaches related aspects of in vitro culture systems for the development of immature oocytes originated from the preantral follicles, as well the techniques to analyze their efficiency.*

**Keywords:** meiotic competence, follicular growth, oocyte.

### Introdução

A disponibilidade de oócitos é um fator limitante no desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas (Smitz e Cortvrindt, 2002). Os métodos atuais para a produção *in vitro* de embriões são dependentes de uma oferta de oócitos competentes, oriundos de grandes foliculos antrais ou pré-ovulatórios, que estão presentes no ovário em número relativamente reduzido (Telfer, 1998). Sabe-se que os foliculos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, armazenando, assim, a maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos (Silva et al., 2003). Dessa forma, a possibilidade de desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* que explorem o grande número de oócitos imaturos provenientes de foliculos pré-antrais de ovários mamíferos deve ser considerada. Atualmente, há um crescente interesse em compreender os mecanismos envolvidos na ativação e posterior crescimento folicular até a maturação dos seus oócitos (Hemamalini et al., 2003).

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica que consiste na obtenção, sob condições artificiais, da maturação de oócitos, preparando-os para a fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2008). A maturação e a fecundação *in vitro* de oócitos originados de foliculos pré-antrais cultivados *in vitro* têm resultado na produção de embriões em suínos (Wu e Tian, 2007) e bubalinos (Gupta et al., 2008) e no nascimento de camundongos (O'Brien et al., 2003).

Este trabalho irá rever aspectos relacionados ao crescimento oocitário, aos sistemas de cultivo *in vitro* para o crescimento de foliculos pré-antrais, aos princípios e sistemas para maturação *in vitro*, e às técnicas para avaliar a eficiência da maturação oocitária.

### Características do crescimento folicular e oocitário

Ao longo do desenvolvimento folicular, os oócitos passam por diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais eventos, que se iniciam com a formação do foliculo primordial e continuam até o momento da ovulação, tornam o oócito competente (Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001). A aquisição da competência ocorre de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares (Bever et al., 1997), visto que o desenvolvimento do foliculo e o de seu oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (Aguillar et al., 2001).

Durante o estágio de foliculo pré-antral, os oócitos aumentam o volume, passando de aproximadamente 20 µm de diâmetro no foliculo primordial para 120 µm no foliculo pré-ovulatório (Salha et al., 1998), o que está correlacionado com o incremento do conteúdo protéico (Schultz e Wasserman, 1977) e o acúmulo de substâncias

essenciais para a maturação, a fecundação e o desenvolvimento embrionário pré-implantação (Eppig, 1994). A formação do embrião é diretamente dependente dos transcritos produzidos pelo oócito durante os eventos antes da concepção. Durante o crescimento, o oócito acumula muitos RNAs mensageiros que irão atuar no desenvolvimento embrionário (Feuerstein et al., 2006; Nogueira et al., 2006). As células da granulosa multiplicam suas camadas e as células tecais se diferenciam do estroma circundante, ocorrendo a formação das junções *Gap* entre o oócito e as células da granulosa. No citoplasma, desenvolve-se o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático liso e as gotículas lipídicas, que assumem uma localização periférica, além da formação da zona pelúcida e dos grânulos corticais (Van Weeler e Rodgers, 1996).

Apesar de todos esses eventos, os oócitos de folículos pré-antrais ainda são incapazes de retomar o desenvolvimento. Entretanto, é nesta fase que são sintetizadas moléculas essenciais para o reinício da meiose e de componentes do fator promotor da meiose (Goudet et al., 1998). Além disso, a capacidade dos oócitos de completar todas as etapas do desenvolvimento está diretamente relacionada com o tamanho do folículo (Crozet et al., 1995) e do próprio oócito (Hyttel et al., 1997). Desta forma, o desenvolvimento de sistemas *in vitro* que suportem o crescimento do oócito ajudaria a identificar alguns fatores essenciais para a aquisição de competência do desenvolvimento.

### Sistemas *in vitro* para crescimento dos folículos pré-antrais

Diferentes métodos de cultivo *in vitro* têm sido desenvolvidos a fim de se manter a viabilidade, promover o crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* e obter oócitos maduros para produção *in vitro* (PIV) de embriões (Fig. 1).

| ESPÉCIE                                   | Crescimento | Antro | Embrião | Nascimento |
|---|-------------|-------|---------|------------|
| <b>GATA</b><br>Jewgenow et al., 1998      |             |       |         |            |
| <b>MACACA</b><br>Nayudu et al., 2003      |             |       |         |            |
| <b>CADELA</b><br>Serafim et al., 2010     |             |       |         |            |
| <b>VACA</b><br>McCaffery et al., 2000     |             |       |         |            |
| <b>VELHA</b><br>Arunakumari et al., 2010  |             |       |         |            |
| <b>CABRA</b><br>Magalhães et al., 2010    |             |       |         |            |
| <b>PORCA</b><br>Wu et al., 2001           |             |       |         |            |
| <b>BÚFALA</b><br>Gupta et al., 2008       |             |       |         |            |
| <b>CAMUNDONGA</b><br>O'Brien et al., 2003 |             |       |         |            |

Figura 1. Principais avanços obtidos com a utilização de oócitos oriundos de folículos pré-antrais de mamíferos cultivados *in vitro*.

Variações nos sistemas de cultivo são adotadas, no entanto, em termos de morfologia folicular e do tipo de contato do folículo com o substrato (plástico da placa; ágar; componentes da matriz extracelular - colágeno, fibronectina, laminina, matrigel; monocamada de células somáticas), eles podem ser divididos em: (i) cultivos em que o objetivo é manter a estrutura esférica do folículo intacta, por meio da internalização do folículo no substrato (sistema tridimensional), e (ii) cultivos que permitem que os folículos sejam remodelados, uma vez que o folículo fica sobre o substrato (sistema bidimensional; Demeestere et al., 2002; Pangas et al., 2003; Basso et al., 2007; Figueiredo et al., 2008).

Em cultivos bidimensionais, mesmo que os componentes individuais permaneçam funcionais, a arquitetura folicular não pode ser mantida, devido à aderência e ao achatamento dos folículos ao substrato



(Gomes et al., 1999). Como alternativa, pode-se utilizar um sistema tridimensional, como, por exemplo, o cultivo de ovário inteiro ou de seus fragmentos visando manter a arquitetura tridimensional, preservar a integridade estrutural do tecido e permitir as interações entre os folículos, que são essenciais para desenvolvimento normal (Abir et al., 2006). No entanto, estes sistemas podem ter significativas limitações de nutrientes quando a massa de tecido se desenvolve, ou o estroma pode exercer controle inibitório sobre o início do crescimento dos folículos primordiais (Wandji et al., 1996).

A escolha do sistema de cultivo será ditada pelos objetivos do estudo. Quando o objetivo é usar as células somáticas no cocultivo de oócitos, um melhor rendimento é obtido ao se empregar um sistema bidimensional. Quando o objetivo é determinar as relações fisiológicas intrafoliculares, é melhor manter os folículos encapsulados no substrato, utilizando-se um sistema tridimensional (Smitz e Cortvrindt, 2002).

Outro aspecto muito importante do sistema *in vitro* para o crescimento de folículos pré-antrais é a composição do meio de cultivo (Smitz e Cortvrindt, 2002). Várias substâncias adicionadas podem influenciar a sobrevivência e o crescimento folicular, incluindo antibióticos, tampões, substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, monossacarídeos, etc.), diferentes fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e diversos fatores de crescimento (Figueiredo et al., 2008). A escolha do sistema de cultivo e a adição de fatores que promovam o crescimento e a obtenção de oócitos competentes para produção de embriões *in vitro* podem variar de acordo com a classe e o tamanho do folículo e, ainda, com a espécie em estudo. No entanto, é conhecido que o crescimento oocitário em folículos pré-antrais é estimulado por fatores de crescimento, como Kit Ligand (ovino: Driancourt et al., 2000), fator inibidor de leucemia (camundongo: Reynaud et al., 2000) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (caprinos: Zhou e Zhang, 2005), fator de crescimento epidermal (caprinos: Silva et al., 2004), e pela gonadotrófica FSH (caprinos: Matos et al., 2007). Entretanto, um sistema que suporte todo o desenvolvimento folicular desde o estágio primordial ainda não foi alcançado em animais domésticos até o momento (Picton et al., 2008).

### Princípios da maturação oocitária

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica reprodutiva que permite que os oócitos atinjam a metáfase II *in vitro* e adquiram a competência para serem fecundados e, assim, iniciem a embriogênese (Smitz et al., 2004). Na maioria das espécies, os oócitos inclusos em folículos primordiais presentes no ovário se encontram em estágio quiescente, além de serem pequenos e imaturos. Contudo, em intervalos regulares, certo número deles começa a crescer e maturar, mas, de todo esse potencial *in vivo*, somente um oócito será ovulado e o restante sofrerá atresia (Hardy et al., 2000). Assim, a MIV tem o potencial de resgatar uma grande quantidade de oócitos imaturos ainda no ovário e cultivá-los *in vitro* até a maturação (Gilchrist et al., 2008). No entanto, os oócitos maturados *in vitro* não têm o mesmo potencial de desenvolvimento que os oócitos maturados *in vivo* (Chian et al., 2004).

O processo de maturação oocitária consiste em uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos (Fissore et al., 2002). Este processo é composto por inúmeras modificações estruturais e moleculares no citoplasma (maturação citoplasmática) que culminam com a configuração cromossômica em metáfase II (maturação nuclear) precedendo a penetração do espermatozoide e sua ativação para fecundação (Roth e Hansen, 2005). Atualmente, evidências disponíveis indicam que as condições de cultivo adequadas suportam a maturação nuclear, mas frequentemente não conseguem sustentar a maturação citoplasmática (Combelles et al., 2002). A natureza desta deficiência ainda está sujeita à especulação (Vanhoutte et al., 2007).

Os folículos em crescimento e/ou dominantes apresentam oócitos que permanecem bloqueados no estágio de diplóteno da prófase meiótica. *In vivo*, a retomada da meiose é iniciada por uma onda pré-ovulatória de LH e acontece somente em oócitos de folículos dominantes (pré-ovulatórios), totalmente crescidos e meioticamente competentes (Van Der Hurk e Zhao, 2003). Além dos eventos fisiológicos, a retomada da meiose pode ocorrer como consequência da atresia, quando a qualidade do folículo e o controle meiótico estão comprometidos (Downs, 1993), ocorrendo também naqueles oócitos retirados de folículos terciários ou após a ovulação, os quais perderam o contato com o fator inibidor da meiose presente no folículo e nos quais a maturação nuclear passa a ocorrer espontaneamente (Sirard e Coenen, 1993).

Antes e durante o período da onda de LH, o oócito é circundado por uma camada compacta de células do *cumulus*. Das células mais internas do *cumulus*, numerosas projeções penetram na zona pelúcida e atingem o oolema com junções *Gap*. Pouco antes da onda de LH, ocorre uma quebra dessas junções. Então, durante o período entre a onda de LH e a ovulação, o oócito sofre alterações marcantes, que culminam com a maturação oocitária (Richards et al., 2002).

O oócito é, então, considerado o “regente” porque, desde o período de organização folicular e progressão até a ovulação, ele coordena o desenvolvimento do folículo, além de controlar a proliferação e diferenciação de células da granulosa em células que produzam proteínas e esteróides, o que leva ao aumento da responsividade às gonadotrofinas, bem como à diferenciação de células da teca e à expansão do *cumulus* até a ruptura da parede folicular (Van Der Hurk et al., 2000). Porém, algumas características macroscópicas do folículo também são importantes para determinar o potencial da maturação nuclear e citoplasmática do oócito.

### Maturação nuclear

A maturação nuclear é caracterizada pelo oócito em estágio de metáfase II. A quebra de vesícula germinativa é o primeiro sinal visível de retomada da meiose e pode ocorrer, na espécie caprina, dentro de três horas após o oócito ter sido colocado em meio de maturação (Crozet et al., 1995; Sharma et al., 1996). A maturação nuclear de oócitos pré-ovulatórios é regulada por fatores presentes no fluido folicular, pela interação dos oócitos e células foliculares, bem como por fatores endócrinos, tais como as gonadotrofinas (Kim et al., 2008). Oócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais iniciais adquirem capacidade de quebra da vesícula germinativa apenas quando atingem um determinado diâmetro de acordo com a espécie (maior que 75 µm para camundongos e maior que 110 µm para ruminantes; Eppig e Schroeder, 1989; Fair et al., 1995; Anguita et al., 2007).

Em bovinos, oócitos de 115 µm podem alcançar a quebra de vesícula germinativa, mas, para adquirir capacidade de desenvolvimento embrionário, devem estar com diâmetro superior a 120 µm (Pavlok et al., 1992). Em suínos, a maturação nuclear melhora conforme aumento do diâmetro do oócito, e este, por sua vez, cresce conforme aumento do tamanho folicular e permanece constante quando o folículo atinge 2,8 mm, o que corresponde a oócitos de 120 µm (Bagg et al., 2004). Em caprinos, o diâmetro do oócito está positivamente correlacionado com a porcentagem de oócitos que alcançam a metáfase II e que são capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Em oócitos caprinos, a competência meiótica é adquirida quando o diâmetro do oócito é maior do que 136 µm tanto em fêmeas adultas quanto pré-púberes (Anguita et al., 2007).

Durante o crescimento do oócito dentro do folículo, muitas proteínas são sintetizadas. Algumas dessas proteínas, como o fator promotor de meiose no citoplasma, são essenciais no processo de desenvolvimento do oócito antes e após a ativação do genoma do zigoto (Krisher, 2004). Esse fator é uma proteína quinase constituída por uma subunidade catalítica (p34) e outra regulatória (ciclina B; Gautier e Maller, 1991). É mediada por eventos de fosforilação e desfosforilação, e sua atividade aumenta no estágio de quebra da vesícula germinativa, com alta atividade em metáfase I, decrescendo em anáfase e telófase e alcançando outro pico em metáfase II. Além disso, está relacionada com a retomada da meiose, que é mantida por altos níveis deste fator no citoplasma do oócito, o qual é também descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (Crozet et al., 2000).

O bloqueio meiótico no estágio de vesícula germinativa é mantido pelas altas concentrações do AMP cíclico que é produzido pelas células da granulosa e transportado para o oócito via junções *Gap*. Após a puberdade, uma onda de LH causa o declínio do AMP cíclico, primeiro pelo desligamento das junções *Gap* entre oócito e células da granulosa e depois pela redução da sua produção pela granulosa (Kawamura et al., 2004). O declínio do AMP cíclico provoca a desfosforilação e consequente ativação do complexo fator promotor da meiose, que, por sua vez, está envolvido com a quebra do envelope nuclear, condensação de cromatina, reorganização do citoesqueleto e bloqueio da atividade transcricional (Miller e Russell, 1992).

A quebra da vesícula germinativa consiste na condensação da cromatina, no aparecimento de estruturas denominadas cinetócoros (pontos de ancoragem dos cromossomos aos microtúbulos) e na dissolução da membrana nuclear. Ocorre duplicação dos centríolos, e os cromossomos em pares diploides, que se encontram livres no citoplasma, migram para a região equatorial, caracterizando a metáfase I (Mermillod e Lannou, 1999). O oócito primário sofre divisão meiótica, originando duas células filhas, sendo que 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 metáfase II (Sirard et al., 1992). Em diferentes espécies, varia o tempo requerido para o oócito atingir a metáfase II (Thibault et al., 1987). Oócitos de algumas espécies, inclusive em humanos, quando cultivados *in vitro*, podem sofrer parada em metáfase I e se tornarem incapazes de alcançar a metáfase II (Hardy et al., 2000). Esta condição poderia ocorrer pelo fato de o oócito ainda não ter atingido sua competência meiótica, ou por erros ocorridos na recombinação genética que, sob condições normais, ocorre na fase de prófase I, no estágio de paquíteno. Isto indica que a recombinação genética é um fator chave para que o oócito retome a meiose. Outros fatores responsáveis pelo funcionamento do fuso meiótico exercem uma função importante na transição de metáfase I para metáfase II. Os microfilamentos agem na migração dos cromossomos, e alterações na sua estrutura podem levar à parada em metáfase I. Mesmo quando fecundados, oócitos com defeitos no fuso meiótico frequentemente resultam em embriões com poliploidia (Mrazek e Fulka, 2003).

Em ratos, a pró-metáfase I com condensação dos cromossomos e formação da placa metafásica dura cerca de seis horas, e a metáfase I cerca de quatro horas. Esta duração é importante para a síntese e formação do fuso meiótico, já que a passagem pela anáfase e telófase I é relativamente rápida (Mermillod e Lannou, 1999). Estudos em oócitos humanos com falha após FIV apresentaram anormalidades no fuso em metáfase II com alta probabilidade de sofrer parada nesta fase da meiose devido a alterações na ativação do oócito. Mesmo após a fecundação, falhas na ativação podem ocorrer e impedir a formação dos pró-núcleos, com consequente descondensação da cromatina do espermatozoide. Outras falhas, como a não extrusão do segundo corpúsculo



polar, podem ocorrer, devido a erros na localização do fuso; e, ainda, por ativação partenogenética, estes oócitos podem clivar ou apresentar dois pró-núcleos com apenas um corpúsculo polar (Mrazek e Fulka, 2003).

### Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito de mamíferos passa para se tornar uma célula capaz de fecundar e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial. Estas mudanças dizem respeito à redistribuição das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, a estocagem de proteínas e RNA, o desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio, entre outros (Anguita et al., 2007). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos na competência do oócito ainda não são bem descritos.

A maturação citoplasmática é necessária para a obtenção de condições de bloqueio da polispermia, para descondensar o núcleo do espermatozoide que penetrou e formar o pró-núcleo masculino após a fecundação. Inclui ainda a redistribuição das organelas celulares, com a migração das mitocôndrias para a posição perinuclear e o acúmulo de grânulos na extensão do oolema (Picton et al., 1998). Um oócito que não completou ainda sua maturação citoplasmática possui baixa qualidade e é incapaz de se desenvolver normalmente (Krisner, 2004).

A competência meiótica é gradualmente adquirida durante o período final da oogênese. O estágio final para um bom desenvolvimento, antes da ovulação, requer sincronização entre a maturação nuclear e a citoplasmática (Eppig, 1994). Oócitos de muitas espécies que completaram seu desenvolvimento, quando liberados do folículo, podem maturar espontaneamente. Acredita-se que, prolongando a parada meiótica *in vitro* por bloqueio temporário da maturação nuclear, com uma técnica denominada “cultivo pré-maturação”, pode-se estimular a sincronização entre a maturação nuclear e a citoplasmática. Este bloqueio pode dar tempo para que ocorram as mudanças estruturais e bioquímicas (transcrição de mRNA, modificações de proteínas, relocação e modificações de organelas) de que o oócito necessita para se tornar capaz de ser fecundado e desenvolver o embrião com sucesso (Dieleman et al., 2002; Vanhoutte et al., 2007). Algumas substâncias podem ser utilizadas para prolongar esse bloqueio da meiose *in vitro* (Nogueira et al., 2003). Estas substâncias manipulam as concentrações de AMP cíclico intraoocitários pela inibição de fosfodiesterases específicas no citoplasma do oócito e o mantêm parado no estágio de vesícula germinativa (Nogueira et al., 2006). As fosfodiesterases exercem uma função no controle da maturação nuclear do oócito, sendo responsáveis pela degradação do AMP cíclico que está ligado à retomada da meiose (Feuerstein et al., 2006).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa vêm trabalhando com o intuito de aprimorar a maturação citoplasmática *in vitro* e, conseqüentemente, melhorar a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos. Fatores de crescimento produzidos pelas células durante o desenvolvimento folicular, tais como: fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), já foram testados durante maturação *in vitro* e melhoraram a capacitação dos oócitos (Gonçalves et al., 2007).

Atualmente, a maturação oocitária, a retomada da meiose e a finalização da primeira divisão meiótica ocorrem *in vitro* para todas as espécies estudadas. Números significativos de oócitos imaturos que são maturados até metáfase II e em seguida são submetidos à fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário até a formação de um indivíduo viável variam de acordo com a espécie. No entanto, alterações na maturação citoplasmática são mais aparentes nos estádios finais do desenvolvimento embrionário (Trounson, 2001). Além disso, os baixos resultados da produção *in vitro* de embriões podem ser seguramente atribuídos a dois principais fatores: as condições de cultivo *in vitro* (Russel et al., 2006) e a qualidade dos oócitos selecionados para a maturação *in vitro* (Camargo et al., 2006).

### Qualidade do oócito

O oócito adquire sua capacidade para fecundação e desenvolvimento após longo período de crescimento. Este processo envolve tanto a síntese de componentes citoplasmáticos como o rearranjo e a redução no número de cromossomos. Estes dois eventos são interligados, e sua cronologia é determinante para assegurar que o oócito atinja a maturação nuclear e a citoplasmática simultaneamente. O desenvolvimento embrionário é diretamente comprometido se a maturação do oócito não for completa (Hunter, 2000).

Existem grandes variações quanto aos padrões morfológicos dos oócitos entre as espécies. Oócitos de camundongos e ruminantes apresentam ooplasma claro e quase ausente de granulações, enquanto em equinos, 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, 2002). Desta forma, o oócito pode ter seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do complexo *cumulus*-oócito. A classificação dos oócitos pode ser realizada em uma escala de 1 a 4, sendo: qualidade 1 - *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom; qualidade 2 -



*Cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida; qualidade 3 - *cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino; qualidade 4 - oócito sem *cumulus*, também conhecido como oócito desnudo (Gonçalves et al., 2008).

Diferente da maturação *in vivo*, os oócitos maturados *in vitro* frequentemente têm seu metabolismo alterado e um potencial de desenvolvimento reduzido. Este fato pode ser devido a deficiências no meio de maturação, a uma habilidade intrínseca do oócito, ou a ambos. A regulação da disponibilidade de nutrientes e de enzimas pode ocorrer em diversos níveis (Krisher et al., 2004). Para folículos pré-antrais, o cultivo pode apresentar vantagens, provocando alterações significativas no microambiente do folículo e do oócito antes e durante os processos de maturação. Além disso, tal cultivo pode ser útil para explorar as diferentes respostas do oócito e das células somáticas do folículo quando submetidos a diferentes ambientes e concentrações de moléculas e fatores (Sun et al., 2004). Assim, a qualidade do ambiente onde o oócito foi produzido parece ser de vital importância para o desenvolvimento de sua competência. Muitos estudos têm avaliado as diferentes características foliculares, que podem apresentar fatores associados com o aumento da competência oocitária. Algumas características, como tamanho e integridade folicular, homogeneidade do ooplasma, perfil hormonal e *status* ovariano, possivelmente influenciam o desenvolvimento da competência oocitária (Oussaid et al., 2000).

### Sistemas *in vitro* para maturação oocitária

O sistema *in vitro* ideal para o desenvolvimento oocitário seria aquele em que oócitos isolados atingissem o crescimento e a competência para maturação em um meio definido sem a unidade folicular (Telfer, 1998). Os oócitos isolados de folículos pré-antrais e cultivados sem suas células da granulosa ou em cocultivo com células da granulosa não apresentam um crescimento significativo (Eppig, 1994). Entretanto, oócitos cultivados com junções *Gap* intactas entre o oócito e as células da granulosa crescem e tornam-se competentes para se submeterem à maturação nuclear. Por isso, as ligações fisiológicas íntimas entre os oócitos e as células somáticas no folículo são indispensáveis para o desenvolvimento normal do oócito (Matzuk et al., 2002).

Recentemente, vários sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos para permitir o crescimento *in vitro* de oócitos. A natureza do sistema de cultivo depende do estágio inicial do folículo, o qual tem influência sobre o número de folículos disponíveis, a capacidade de desenvolvimento e a taxa de crescimento, bem como a duração do cultivo. O ideal seria que esse cultivo iniciasse com folículos primordiais, porque eles são mais abundantes, mas tem como desvantagem o fato de o crescimento desta categoria folicular ser mais lento (Eppig, 2001). No entanto, este procedimento aumentaria drasticamente o potencial reprodutivo das espécies mamíferas (Eppig, 2001). Além disso, o tempo requerido para maturação *in vitro* pode variar entre as diferentes espécies (Mingoti, 2005), sendo de 18-24 horas para bovinos (Merton et al., 2003), 28-36 horas para equinos (Carneiro, 2002), 30 horas para caprinos (Sharma et al., 1996) e de 48 horas para suínos (Somfai et al., 2005).

*In vitro*, diferentes condições de cultivo e protocolos já foram testadas para a maturação de oócitos. Vários meios de maturação têm sido utilizados, tais como: fluido sintético de oviduto (SOF; Gandhi et al., 2000), DMEM, Ham's F-10, Ham's F-12 (Smetanina et al., 2000) e meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199). O TCM 199, proposto por Moor et al. (1984), é o meio mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo, geralmente, suplementado com soro fetal bovino, FSH, LH, piruvato, glutamina e antibiótico e/ou outros fatores. Esta suplementação tem o objetivo de estimular o desenvolvimento *in vitro* (Guixue et al., 2001). Entretanto, existem variações entre os diferentes protocolos de PIV.

Os efeitos moleculares que medeiam a influência positiva destes suplementos não estão completamente esclarecidos, mas dados recentes sustentaram o possível envolvimento dos fatores de crescimento influenciando a MIV e melhorando a competência oocitária e, assim, elevando significativamente o número de blastocistos produzidos (Carneiro et al., 2003). As substâncias, como fatores de crescimento, gonadotrofinas, soros específicos e diferentes condições de cultivo, revelaram algum efeito nas taxas de produção e na qualidade embrionária, porém nunca ao ponto de todos os oócitos 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 oócito expressar seu potencial, mas os constituintes originais do oócito controlam a sua habilidade de responder às melhores condições (Sirard, 2001).

A MIV é comumente realizada utilizando meio coberto por óleo de parafina ou óleo mineral para evitar a evaporação (Shimada et al., 2001). No entanto, o óleo pode absorver rapidamente os hormônios esteroides adicionados ao meio ou aqueles secretados pelas células do *cumulus* (Gonçalves et al., 2008), podendo limitar a competência de desenvolvimento de oócitos suínos. Segundo Shimada et al. (2002), a exposição de oócitos suínos ao óleo mineral durante a MIV reduz consideravelmente as taxas de maturação meiótica nessa espécie.

Além da utilização de substâncias reconhecidas reguladoras da maturação nuclear de oócitos em mamíferos, como as citadas anteriormente, outros fatores também estão envolvidos no processo de



foliculogênese como o fluido folicular e o cocultivo com células da granulosa (Carneiro, 2007). O fluido folicular tem sido utilizado com relativa eficiência, com exceção do fluido folicular proveniente de folículos atresícos. O fluido folicular nos meios de maturação em suínos é utilizado com sucesso, pois contém substâncias que agem na expansão do *cumulus oophorus*, na maturação nuclear e na fecundação, por conter altas concentrações da enzima superóxido dismutase, que exerce função importante na proteção do oócito ao estresse oxidativo (Tatemoto et al., 2004). Ali et al. (2004) observaram que a adição de fluido folicular de folículos maiores que 8 mm ao meio de maturação foi capaz de aumentar a produção de embriões. 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). Segundo Matzuk et al. (2002), as células da granulosa são indispensáveis para o crescimento folicular, a diferenciação, o estágio nuclear meiótico, a maturação citoplasmática e a atividade transcricional genômica, sendo constatado que, quando atingem um diâmetro limite, os oócitos suprimem a habilidade das células da granulosa em promover a continuidade de seu crescimento, indicando que o oócito determina não somente o crescimento folicular mas também, indiretamente, o seu próprio crescimento.

Marques et al. (2007) avaliaram a maturação *in vitro* em oócitos suínos em dois diferentes meios (TCM 199 e NCSU23) suplementados com fluido folicular, álcool polivinílico e diferentes suplementações de hormônios, fator de crescimento epidermal (EGF), gonadotrofina coriônica humana e equina (hCG e eCG). Esses pesquisadores verificaram maior eficiência na maturação quando utilizaram o TCM 199 suplementado com EGF (10 ng/ml), hCG (10 UI/ml) e eCG (10 UI/ml). O EGF é um fator de crescimento bastante utilizado em meios de maturação, e o seu principal efeito é estimular a síntese de glutatona intracelular no oócito. A glutatona protege o DNA, age na síntese de proteínas e no transporte de aminoácidos, regula a maturação oocitária por meio do estímulo para a quebra da vesícula germinativa e expansão das células do *cumulus oophorus* (Buccione et al., 1990), além de promover a formação do pró-núcleo masculino durante a fecundação (Whitaker e Knight, 2004). Yoshida et al. (1993) reportaram que o cultivo de oócitos suínos com meio suplementado com cisteína promoveu a formação do pró-núcleo masculino após FIV. A cisteína é um aminoácido que compõe a glutatona. Essa glutatona também tem função importante na ação contra os efeitos tóxicos dos danos oxidativos, inclusive causados pelo metabolismo da glicose no oócito, pois a maturação induzida pelo FSH parece estimular enzimas que aumentam o metabolismo da glicose e a quebra da vesícula germinativa (Downs et al., 1998). No entanto, o metabolismo da glicose é dependente tanto da tensão de oxigênio utilizada para o cultivo como da concentração de espécies reativas de oxigênio no oócito. O estresse oxidativo excessivo contribui para redução no desenvolvimento do oócito e dos embriões *in vitro* (Tatemoto et al., 2001).

Carneiro et al. (2001) afirmaram que o IGF-I (200 ng/ml) incrementa os índices de maturação nuclear em equinos. Posteriormente, foi observado que sua adição ao meio induz a um maior acúmulo de proteína quinase ativadora da maturação (MAPK) no citoplasma, o que, por sua vez, refletiu em maior desenvolvimento embrionário após a partenogênese de oócitos eqüinos (Li et al., 2004). 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 proteicas. Entretanto, devido às preocupações sanitárias, a utilização de BSA como suplemento proteico é amplamente difundida na MIV de oócitos equinos (Curcio, 2005).

Além das substâncias adicionadas ao meio, os oócitos em cultivo também são afetados por condições fisiológicas específicas, tais como: osmolaridade, composição iônica, temperatura, pH, CO<sub>2</sub> e tensão de oxigênio, que, por sua vez, tornam-se parâmetros influenciadores importantes da capacidade de desenvolvimento do oócito (Hunter, 2000). Sob condições de alta tensão de oxigênio durante a MIV, oócitos bovinos necessitam de baixas concentrações de glicose para diminuir as espécies reativas de oxigênio, aumentar a concentração de glutatona e assim manter a sua competência para o desenvolvimento (Hashimoto et al., 2000). Por outro lado, quando se utilizam baixas tensões de oxigênio na MIV de oócitos bovinos, apesar de tal fato diminuir as espécies reativas de oxigênio, há a desvantagem de inibir a produção de ATP e a progressão até metáfase II. No entanto, quando a glicose é adicionada ao meio nestas condições, esta aumenta a proporção de oócitos que atingem metáfase II. Em camundongos, a exposição dos oócitos a baixas tensões de oxigênio pode aumentar o número de células dos blastocistos, entretanto o peso fetal foi reduzido quando comparado a altas concentrações de oxigênio (Banwell et al., 2007).

A exposição de oócitos a temperaturas muito baixas ou elevadas (i.e. choque térmico) na fase de vesícula germinal (Payton et al., 2004), ou durante a fase inicial de maturação (Roth e Hansen, 2004), interfere no processo de maturação (Roth e Hansen, 2005), devido a alterações que ocorrem no citoesqueleto (Shin e Kim, 2003). A exposição das células somáticas ao choque térmico durante a fase S pode resultar em condensação prematura do cromossomo e formação de micronúcleos (Swanson et al., 1995) e, durante a fase M, resulta na desmontagem do fuso mitótico, poliploidia e falha na citocinese (Vidair et al., 1993). No campo da produção de animais domésticos, como também na medicina humana e nos estudos ligados à preservação de espécies, as biotecnologias reprodutivas acabam tendo uma aplicação limitada, visto que nem todos os oócitos estão realmente aptos para se desenvolverem *in vitro*. Neste sentido, vários métodos de avaliação para determinar a eficiência da maturação *in vitro* vêm sendo estudados.



### Técnicas de avaliação da maturação oocitária

A morfologia e o grau de expansão das células do *cumulus* são métodos clássicos para avaliação da maturação oocitária. Em bovinos, a expansão e o enegrecimento do *cumulus* são características utilizadas para se verificar a maturação oocitária e estão diretamente relacionados com boa qualidade embrionária (Wurth e Kriup, 1992). Oócitos bovinos que exibam citoplasma mais heterogêneo apresentam maior capacidade de fecundação normal e com redução da polispermia, pois exibem melhor distribuição dos grânulos corticais após a MIV (Nagano et al., 1999).

O estágio nuclear dos oócitos após a MIV pode ser examinado sob microscopia ótica com contraste de fase, após fixação dos oócitos com metanol-ácido acético e coloração com 1% de lacmóide em 45% de solução de ácido acético (Hunter e Polge, 1966) ou com 1% deorceína em 40% de solução de ácido acético (Li et al., 2002). Outra técnica para visualização dos cromossomos dos oócitos e determinação dos estádios nucleares de maturação é a microscopia por fluorescência (Miyara et al., 2003). Após serem submetidos às técnicas de MIV, os oócitos são desnudados, marcados com Hoechst 33342 e visualizados em microscópio invertido com fluorescência (Grondahl et al., 1995). Os oócitos que são capazes de retomar a meiose apresentam dois grupos de cromossomos bem condensados, com corpúsculo polar evidente (Sun et al., 2004). O fuso de metáfase I e II, as pontes citoplasmáticas e o corpúsculo polar podem ser corados por meio da imunofluorescência com anticorpo antitubulina (isolado de ovos de ouriço do mar ou de outras fontes). Este procedimento tem sido utilizado para acompanhamento da progressão da maturação *in vitro* em oócitos de camundongos, bovinos e outras espécies (Hoth e Hansen, 2005). A imunofluorescência de oócitos humanos com fosfodiesterase é largamente utilizada para verificar a parada nuclear temporária em vesícula germinativa. Esta técnica também pode ser melhor observada em microscopia confocal por varredura a laser para uma melhor visualização de diferentes planos da mesma estrutura (Vanhoutte et al., 2007).

Infelizmente, somente métodos invasivos que causam a destruição dos oócitos são capazes de prever com relativa precisão a qualidade deles. No entanto, recentemente tem sido utilizado o corante Azul Cresil Brilhante, um método não invasivo, para tal finalidade. Esta substância é capaz de determinar a atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) presente em oócitos durante o crescimento (Rodríguez-González et al., 2003).

A maturação citoplasmática pode ser avaliada pela distribuição das organelas por microscopia eletrônica (Fernandes, 2004), migração dos grânulos corticais (Curcio, 2005), clivagem partenogênica (Carneiro et al., 2001) ou técnicas de fecundação (Carnevale, 1996). A despeito da grande quantidade de informações disponíveis sobre o assunto, não se chegou ainda a um método ideal para avaliação da maturação citoplasmática que não seja a própria fecundação e o posterior desenvolvimento normal do embrião e do feto (Krisher, 2004).

### Considerações finais

O crescimento de folículos primordiais *in vitro* seguido pela maturação oocitária é capaz de fornecer um grande número de oócitos maduros para posteriores programas de transferência embrionária e clonagem. Nesse contexto, os sistemas de maturação *in vitro* oferecem condições razoáveis para o desenvolvimento do oócito após a fecundação e o cultivo, visto que a maturação nuclear e a fecundação não diferem substancialmente do processo *in vivo*. Entretanto, para a produção *in vitro* de embriões em larga escala, faz-se necessário um melhor entendimento das substâncias que controlam a foliculogênese inicial, visando ao desenvolvimento de meios de cultivo que assegurem a ativação, o crescimento e a maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais.

Até o presente momento, as razões para a falha dos oócitos de ruminantes em completar a meiose *in vitro* não foram determinadas, porém podem estar relacionadas a alterações nas reações bioquímicas envolvidas no processo meiótico. O entendimento das particularidades da fisiologia, a adição de hormônios e os fatores de crescimento específicos nos meios de cultivo proporcionaram avanços na MIV em mamíferos. Entretanto, mais estudos são necessários para incrementar de forma eficiente a produção *in vitro* de embriões nas diferentes espécies.

### Referências bibliográficas

- Abir R, Nitke S, Bem-Haroush A, Fisch B.** *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol Histopathol*, v.26, p.887-898, 2006.
- Aguillar JJ, Woods GL, Miragaya MH.** Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine *cumulus*-oocyte complexes. *Theriogenology*, v.56, p.745-758, 2001.
- Ali A, Coenen K, Bousquet D, Sirard MC.** Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the development competence of bovine oocyte. *Theriogenology*, v.62, p.1596-1606, 2004.
- Anguita B, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT.** Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes.





*Theriogenology*, v.67, p.526-536, 2007.

**Bagg MA, Vassena R, Papasso-Brambilla E, Grupen CG, Armstrong DT, Gandolfi F.** Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology*, v.62, p.1003-1011, 2004.

**Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG.** Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod*, v.22, p.2768-2775, 2007.

**Basso AC, Garcia JM, Esper CR.** Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.44, p.134-143, 2007.

**Bevers MM, Dieleman SJ, Van Der Hurk R.** Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, v.47, p.13-22, 1997.

**Brevini-Gandolfi TAL, Gandolfi F.** The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255-1276, 2001.

**Buccione R, Schroeder A, Eppig J.** Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*, v.43, p.543-547, 1990.

**Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR.** Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim Reprod*, v.3, p.19-28, 2006.

**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.

**Carneiro GF.** Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. *Ciênc Tecnol Vet*, v.2, p.5-10, 2002.

**Carneiro GF, Nakazawa M, Castro SBM, Gomes YM.** Efeito do IGF-I na maturação *in vitro* de oócitos caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17, 2003, Beberibe, CE. *Anais...* Beberibe, CE: SBTE, 2003. p.286.

**Carneiro GF.** Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.268-273, 2007.

**Carnevale EM.** Gamete intrafallopian transfer. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.47-60, 1996.

**Chian RC, Lim JH, Tan SL.** State of the art in in-vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v.16, p.211-219, 2004.

**Combelles CM, Racowsky C, Albertini DF.** Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod*, v.17, p.1006-1016, 2002.

**Crozet N, Ahmed A, Dubos MP.** Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.105, p.293-298, 1995.

**Crozet N, Dahirel M, Gall L.** Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J Reprod Fertil*, v.118, p.367-373, 2000.

**Curcio BR.** Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos 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.

**Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, Van den Bergh M, Devreke F, Englert Y.** Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Hum Reprod*, v.17, p.2152-2159, 2002.

**Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM.** Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v.57, p.5-20, 2002.

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

**Downs SM, Humpherson PG, Eleese HJ.** Meiotic induction in *cumulus* cell-enclosed mouse oocyte: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol Reprod*, v.58, p.1084-1094, 1998.

**Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J.** Roles of Kit and Kit Ligand in ovarian function. *Rev Reprod*, v.5, p.143-152, 2000.

**Eppig JJ.** Further reflections on culture systems for the growth of oocytes *in vitro*. *Hum Reprod*, v.9, p.974-976, 1994.

**Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, p.829-838, 2001.

**Eppig JJ, Schroeder AC.** Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, v.41, p.268-276, 1989.

**Fair T, Hyttel P, Greve T.** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, v.42, p.437-442, 1995.

**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.

**Feuerstein P, Cadoreta V, Dalbies-Trana R, Guérifa F, Royèrea D.** Le dialogue ovocyte-cumulus. *Gynecol Obstet Fertil*, v.34, p.793-800, 2006.

**Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos incluídos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.303-327.

**Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J.** Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*, v.124, p.745-754, 2002.

**Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL.** A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod*, v.15, p.395-401, 2000.

**Gautier J, Maller JL.** Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *Embo J*, v.10, p.177-182, 1991.

**Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG.** Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, v.14, p.159-177, 2008.

**Gomes JE, Correia SC, Gouveia-Oliveira A, Cidado AJ, Plancha CE.** Three-dimensional environments preserve extracellular matrix compartments of ovarian follicles and increase FSH-dependent growth. *Mol Reprod Dev*, v.54, p.163-172, 1999.

**Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.

**Gonçalves PBD, Oliveira MAL, Mezzalana A, Montagner MM, Visitin JA, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.261-291.

**Goudet G, Belin F, Bezard J, Gerard N.** Maturation-promoting factor (MPF) and MAPK expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. *Mol Hum Reprod*, v.4, p.563-570, 1998.

**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.

**Guixue Z, Luciano AM, Coenen K.** The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, p. 1733-1743, 2001.

**Gupta PS, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.** Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008

**Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RML.** *In vitro* maturation of oocytes. *Br Med Bull*, v.56, p.588-602, 2000.

**Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H.** Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev*, v.56, p.520-526, 2000.

**Hemamalini NC, Rao BS, Tamilmani G, Amarnath D, Vagdevi R, Naidu KS, Reddy KK, Rao VH.** Influence of transforming growth factor- $\alpha$ , insulin like growth factor $\beta$ , epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small Rumin Res*, v.50, p.11-22, 2003.

**Hoth Z, Hansen PJ.** Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v.129, p.235-244, 2005.

**Hunter MG.** Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod*, v.5, p.122-130, 2000.

**Hunter RHF, Polge C.** Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fertil*, v.12, p.525-531, 1966.

**Hyttel P, Fair T, Caresen H, Greve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.

**Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA.** Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.101, p.7323-7328, 2004.

**Kim BK, Anower Javed M, Kang SR, Kim D, Chang-Hee HAN, Huh MK, Kamal T.** Effects of spermatozoa during *in vitro* meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.83-92, 2008.

**Krisher RL.** The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*, v.82, p.45-51, 2004.

**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.

**Li Z, Jiang Q, Sabet MR, Zhang Y, Ritchie T, Engelhardt JF.** Conditions for *in vitro* maturation and artificial activation of ferret oocytes. *Biol Reprod*, v.66, p.1380-1386, 2002.

**Marques MG, Nicacio AC, Oliveira VP, Nascimento AB, Caetano HVA, Mendes CM, Mello MRB, Milazzotto MP, Assumpção MEOA, Visintin JA.** *In vitro* maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Anim Reprod Sci*, v.97, p.375-381, 2007.

**Matos, M.H.T.; Lima-Verde, I.B.; Luque, M.C.A.; Maia Jr, J.E.; Silva, J.R.V.; Celestino, J.J.H.; Martins, F.S.; Bão, S.N.; Lucci, A.M.; Figueiredo, J.R.** Essential role of follicle stimulating hormone in the



- maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v.15, p.173-182, 2007.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ.** Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conservation. *Science*, v.296, p.2178-2190, 2002.
- Mermillod P, Le Lannou D.** Maturation ovocytairé *in vivo* et *in vitro* chez les mammifères. In: Hamamah S, Menezo Y. *Ovocyte et embryon de la physiologie à la pathologie*. Paris Ellipses Edition, 1999. p.95-122.
- Merton JS, De Roos APW, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v.59, p.651-674, 2003.
- Miller JB, Russell P.** The cdc 25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, v.68, p.407-410, 1992.
- Mingoti GV.** Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Simpósio Tópicos Avançados em Biotecnologias da Reprodução, 1, 2005, Jaboticabal: Jaboticabal, SP: UNESP, 2005.
- Miyara F, Aubriot F, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Herve F, Dumont-Hassan M, Lemeur A, Cohen-Bacrie P, Debey P.** Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod*, v.18, p.1494-1503, 2003.
- Moor RM, Kruip TAM, Green D.** Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology*, v.21, p.103-106, 1984.
- Mrazek M, Fulka JJ.** Failure of oocyte maturation: Possible mechanisms for oocyte maturation arrest. *Hum Reprod*, v.18, p.2249-2252, 2003.
- Nagano M, Takahashi Y, Katagiri S.** *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters, *J Vet Med Sci*, v.61, p.531-535, 1999.
- Nogueira D, Cortvrindt R, De Matos DG, Vanhoutte L, Smitz J.** Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro*. *Biol Reprod*, v.69, p.2045-2052, 2003.
- Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, Smitz J.** Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod*, v.74, p.177-184, 2006.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.** A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod*, v.8, p.1682-1686, 2003.
- Oussaid B, Lonergan P, Khatir H, Guler A, Monniaux D, Touze JL, Beckers JF, Cognie Y, Mermillod P.** Effect of GnRH antagonist induced prolonged follicular phase on follicular atresia oocyte developmental competence *in vitro* in superovulated heifers. *J Reprod Fertil*, v.118, p.137-144, 2000.
- Pangas SA, Saudye H, Shea LD, Woodruff TK.** Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell-oocyte complexes. *Tissue Engineering*, v.9, p.1013-1021, 2003.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H.** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Develop*, v.31, p.63-67, 1992.
- Payton RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL.** Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. *Biol Reprod*, v.71, p.1303-1308, 2004.
- Picton HM, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v.145, p.27-37, 1998.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL.** The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v.136, p.703-715, 2008.
- Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Driancourt MA.** Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev*, v.56, p.483-494, 2000.
- Richards JS, Russel DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC.** Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and lutenization. *Recent Prog Horm Res*, v.57, p.195-220, 2002.
- Rodríguez-González E, López-Bejar M, Izquierdo D, Paramio MT.** Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev*, v.43, p.179-187, 2003.
- Roth Z, Hansen PJ.** Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v.129, p.235-244, 2005.
- Roth Z, Hansen PJ.** Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod*, v.71, p.1898-1906, 2004.
- Russel DF, Bagir S, Bordignon J, Betts DH.** The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.1255-1270, 2006.
- Salha O, Abusheika N, Sharma V.** Dynamics of human follicular growth and *in vitro* oocyte maturation. *Hum Reprod Update*, v.4, p.816-832, 1998.
- Schultz RM, Wassarman PM.** Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci*, v.24, p.167-194, 1977.
- Sharma GT, Majumdar AC, Bonde SW.** Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*.



*Small Rumin Res*, v.22, p.25-30, 1996.

**Shimada M, Kawano N, Tereda T.** Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media. *Reproduction*, v.124, p.557-563, 2002.

**Shimada M, Zeng WX, Terada T.** Inhibition of PI 3-kinase or MEK leads to suppression of p34cdc2 kinase activity and meiotic progression beyond the MI stage in porcine oocytes surrounded with cumulus cell. *Biol Reprod*, v.65, p.442-448, 2001.

**Shin MR, Kim NH.** Maternal gamma (g)-tubulin is involved in microtubule reorganization during bovine fertilization and parthenogenesis. *Mol Reprod Dev*, v.64, p.438-445, 2003.

**Silva JRV, Brasil AF, Santos RR, Costa SHF, Rodrigues APR, Ferreira MAL, Machado VP, Figueiredo JR.** Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. *Ciênc Rural*, v.33, p.913-919, 2003.

**Silva JRV, Van Der Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in goat ovaries. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004.

**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.

**Sirard MA.** Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241-1254, 2001.

**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, Richard F, Mayes M.** Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, v.49, p.483-497, 1998.

**Smetanina IG, Tatarinova LV, Krivokhardchennko AS.** The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Ontogenez*, v.31, p.139-143, 2000.

**Smitz JEJ, Cortvrindt RG.** The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, v.123, p.185-202, 2002.

**Smitz JEJ, Nogueira D, Vanhoutte Matos DG, Cortvrindt RN.** Oocyte: *in vitro* maturation. In: Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocr Metab Disord*, v.3, p.5-12, 2004.

**Somfai T, Kikuchi K, Medvedev S, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Sato E, Nagai T.** Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.90, p.307-328, 2005.

**Squires EL.** Maturation and fertilization of equine oocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.31-45, 1996.

**Sun F, Betzendahl I, Shen Y, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U.** Preantral follicle culture as a novel *in vitro* assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. *Mutagenesis*, v.19, p.13-25, 2004.

**Swanson PE, Carroll SB, Zhang XF, Mackey MA.** Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. *Am J Pathol*, v.146, p.969-971, 1995.

**Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada A.** Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod*, v.71, p.1150-1157, 2004.

**Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N.** Enhancement of developmental competence after *in vitro* fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-a-glucoside during *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, v.65, p.1800-1806, 2001.

**Telfer EE.** *In vitro* models for oocyte development. *Theriogenology*, v.49, p.451-460, 1998.

**Thibault C, Szollosi D, Gerard M.** Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*, v.27, p.865-896, 1987.

**Trounson A.** The derivation and potential use of human embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev*, v.13, p.523-532, 2001.

**Van Der Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM.** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update*, v.6, p.457-474, 2000.

**Van Der Hurk R, Zhao J.** Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. *Acta Sci Vet*, v.31, p.188-205, 2003.

**Van Weeler I, Rodgers RJ.** Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biol Reprod*, v.55, p.1003-1011, 1996.

**Vanhoutte L, Sutter P, Nogueira D, Gerris J, Dhont M, Van Der Elst J.** Nuclear and cytoplasmic maturation of *in vitro* matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod*, v. 22, p. 1239-1246, 2007.

**Vidair CA, Doxsey SJ, Dewey WC.** Heat shock alters centrosome organization leading to mitotic dysfunction and cell death. *J Cell Physiol*, v.154, p.443-445, 1993.

**Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE.** Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial



follicles. *Biol Reprod*, v.55, p.942-948, 1996.

**Whitaker BD, Knight JW.** Exogenous  $\gamma$ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology*, v.62, p.311-322, 2004.

**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.

**Wu J, Benjamin RE, Carrell DT.** *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v.64, p.375-381, 2001.

**Wu J, Tian Q.** Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*, v.15, p.233-240, 2007.

**Wurth YA, Kriup THAM.** Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. In: International Congress on Animal Reproduction, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: ICAR, 1992. v.1, p.387-389.

**Yoshida M.** Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v.35, p.76-81, 1993.

**Zhou H, Zhang Y.** Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest Anim Endocrinol*, v.28, p.235-242, 2005.

---