

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - FMVZ**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**DIFERENÇAS NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS**  
**BOVINOS MATURADOS *IN VIVO* VERSUS *IN VITRO***

**MAICON GAISSLER LORENA PINTO**

**DOCENTES: PROF. DR. SONY DIMAS BICUDO**  
**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA DENISE LOPES**

**BOTUCATU – SP, ABRIL DE 2002**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - FMVZ**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**DIFERENÇAS NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS**  
**BOVINOS MATURADOS *IN VIVO* VERSUS *IN VITRO***

**MAICON GAISSLER LORENA PINTO**

MONOGRAFIA APRESENTADA À DISCIPLINA  
SEMINÁRIOS I, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA VETERINÁRIA, ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL, DA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E  
ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, CAMPUS DE  
BOTUCATU.

**BOTUCATU – SP, ABRIL DE 2002**

## SUMÁRIO

<i>SUMÁRIO</i> _____	1
<b>1. INTRODUÇÃO</b> _____	2
<b>2. CRESCIMENTO, CAPACITAÇÃO E MATURAÇÃO FINAL DO OÓCITO</b> _____	3
<b>3. OÓCITOS MATURADOS IN VIVO VERSUS IN VITRO</b> _____	4
<b>4. COMO OS OÓCITOS ADQUIREM COMPETÊNCIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO?</b> _____	6
<b>5. FATORES QUE AFETAM O POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO</b> _____	7
<b>5.1. O DIÂMETRO DO FOLÍCULO E DO OÓCITO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO     IN VITRO</b> _____	7
<b>5.2. GRAU DE DIFERENCIAÇÃO FOLICULAR E A COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO     DOS OÓCITOS</b> _____	8
<b>6. ABORDAGENS PARA ELEVAR A COMPETÊNCIA DE OÓCITOS PARA O DESENVOLVIMENTO IN VITRO</b> _____	9
<b>6.1. SISTEMAS DE MATURAÇÃO</b> _____	9
<b>6.2. INIBIÇÃO REVERSÍVEL DA MEIOSE</b> _____	10
<b>6.3. MANIPULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR</b> _____	10
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> _____	12
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	13

## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões bovinos tem sido empregada comercialmente com resultados satisfatórios. O processo da maturação *in vitro* possibilita a formação de blastocistos após fecundação e cultivo *in vitro*. Porém a eficiência por oócito maturado *in vitro* é reduzida quando comparada à maturação *in vivo* em uma vaca cíclica normal, ou mesmo superestimulada.

Além disso, são descritos diversos problemas com fetos e bezerros originados de embriões produzidos *in vitro*, tais como: abortos, distocias, elevado peso ao nascimento (síndrome do bezerro grande), elevada mortalidade neonatal ( KRUIP e DEN DASS, 1997; FARIN et al., 2001) e até mesmo lesões cerebrais (RICHARD E SIRARD, 1996). O desenvolvimento de um oócito até um bezerro saudável envolve uma série extensa de processos, nos quais cada passo determina o sucesso dos estágios seguintes. Desse modo, o potencial de desenvolvimento de um oócito e a qualidade de sua maturação podem influenciar a sobrevivência e saúde da progênie.

Sobretudo a produção *in vitro* de embriões é uma tecnologia recente e que certamente está evoluindo na direção de melhores índices produtivos e atenuação dos efeitos indesejados. Apesar do crescente conhecimento sobre a fisiologia ovariana, bem como dos mecanismos de regulação do folículo e seu oócito, pouco progresso tem sido obtido nos sistemas de maturação *in vitro*, os quais ainda não permitem a melhor expressão do potencial de desenvolvimento dos oócitos (SIRARD e BLONDIN, 1996). Há diferenças evidentes quanto a capacidade de desenvolvimento embrionário entre oócitos maturados *in vitro* e aqueles maturados *in vivo* (CHOI et al., 1998).

O objetivo desta monografia é rever algumas diferenças entre ambos os modelos de maturação dos oócitos bovinos; destacando o impacto dessas diferenças sobre o potencial de desenvolvimento após a fertilização e cultivo *in vitro*.

## 2. CRESCIMENTO, CAPACITAÇÃO E MATURAÇÃO FINAL DO OÓCITO

Ao longo do desenvolvimento folicular os oócitos experimentam diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais eventos, que iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, são responsáveis por tornar o oócito competente, o que significa que esse está pronto para uma adequada fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (BREVINI GANDOLFI e GANDOLFI, 2001). A aquisição ocorre então de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares (BEVERS et al., 1997), visto que o desenvolvimento do folículo e seu oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (AGUILLAR et al., 2001).

Didaticamente, a competência de desenvolvimento é adquirida ao longo de três fases distintas: a fase de desenvolvimento do oócito, a fase de capacitação e a maturação final (HYTTEL et al., 1997).

A fase de desenvolvimento do oócito proporciona um acréscimo no diâmetro de um oócito com menos de 30  $\mu\text{m}$  para mais de 110  $\mu\text{m}$ , quando os folículos terciários atingem aproximadamente 3 mm (HYTTEL et al., 1997). Nessa fase ocorre a formação das “Gap Junctions” entre o oócito e as células da granulosa. No ooplasma desenvolve-se o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático liso e as gotículas lipídicas, que assumem uma localização periférica (FAIR et al., 1996). Também ocorre a formação da zona pelúcida e dos grânulos corticais (VAN WEELER e RODGERS, 1996). Durante o crescimento do oócito, alguns transcritos são necessários para a síntese de proteínas que serão utilizadas no interior do oócito ou fora dele. Acredita-se que o armazenamento de determinados rRNAs e proteínas é necessário para conferir a competência ao oócito (SIRARD e COENEN, 1995). Ao final desta fase, a atividade de transcrição é drasticamente diminuída e o oócito já é capaz de reiniciar a meiose e atingir a metáfase II.

A fase de capacitação do oócito, também referida como fase de pré-maturação (DIELEMAN et al., 2002), compreende o período de tempo entre o estabelecimento da dominância folicular até o momento da ocorrência do pico pré-ovulatório de LH. Durante a fase de crescimento de uma onda folicular onde ainda não há dominância, o diâmetro folicular aumenta de 3mm até aproximadamente 8mm mas a ultra-estrutura geral do oócito permanece idêntica àquela observada ao final da fase de

desenvolvimento do oócito (HYTTEL et al., 1997). Quando a dominância folicular é estabelecida, o tamanho do complexo de Golgi do oócito do folículo dominante reduz-se gradualmente, enquanto que o número de gotas lipídicas aumenta e os grânulos corticais deslocam-se para uma posição mais superficial no oócito (GORDON, 1994). Além disso, o envelope nuclear torna-se ondulado e o nucléolo assume uma estrutura anelada, com um centro fibrilar, um vacúolo central e vários vacúolos secundários ao redor (HYTTEL et al., 1997). Essa vacuolização do nucléolo pode refletir a dispersão do nucléolo, como pode representar a atividade funcional do núcleo do oócito. Sirard et al. (1989) demonstraram que CCO requerem uma fase de transicional de uma a duas horas, antes da maturação, para a síntese de proteínas, embora não esteja claro se esta transcrição ocorra no oócito ou nas células do cumulus.

A maturação final do oócito ocorre no folículo ovulatório, após o pico de LH com o objetivo de produzir um oócito haplóide. Ocorre o reinício da meiose e o rompimento da vesícula germinativa, e a maturação nuclear progride até a metáfase II (GORDON, 1994). O citoplasma é caracterizado por contínua deposição lipídica, máxima redução do tamanho do complexo de Golgi e pela formação da estrutura de bloqueio dos grânulos corticais contra a polispermia (HYTTEL et al., 1997). Além disso, ocorre o posicionamento de numerosos ribossomos adjacentes aos cromossomos. Observa-se a perda gradual da comunicação do oócito com as células do cumulus devido à quebra dos processos celulares da corona radiata (GORDON, 1994).

### **3. OÓCITOS MATURADOS *IN VIVO* VERSUS *IN VITRO***

Durante a maturação o oócito reinicia a meiose até a metáfase II e ocorrem diversas alterações dentro do citoplasma, incluindo a migração dos grânulos corticais para a periferia. A camada de células do cumulus se expande e as “Gap Junctions” são quebradas. Algumas diferenças entre o processo *in vivo* e *in vitro* são descritas. A retomada da meiose e a maturação nuclear ocorrem mais rapidamente durante a maturação *in vitro* (Gordon, 1994). Determinadas proteínas são sintetizadas durante os últimos estágios da maturação *in vivo*, o que não ocorre *in vitro* e a expansão das células do cumulus é muito mais intensa durante a maturação *in vivo* (HENDRIKSEN et al., 2000).

O estudo das diferenças de oócitos maturados *in vivo* com aqueles maturados *in vitro* não revelou diferenças significativas quanto à maturação nuclear ou taxas de fertilização e clivagem, mas demonstrou-se diferenças no posterior desenvolvimento embrionário (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987; MARQUANT LE GUIENNE et al., 1989).

A investigação comparada da competência de desenvolvimento de oócitos maturados *in vivo* e oócitos maturados *in vitro* tem sido bastante escassa. Estudos pioneiros demonstraram uma menor competência para o desenvolvimento embrionário de oócitos maturados *in vitro* e transferidos para ovidutos (GREVE et al., 1987; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987). Utilizando-se de indução de pico de LH, Van de Leemput et al., (1999) observaram maior competência de oócitos maturados *in vivo*, quando comparada à competência de oócitos oriundos de ovários de abatedouro, com folículos de 2 a 8mm.

Poucos estudos realizaram a comparação entre a maturação de oócitos *in vivo* e *in vitro* dentro das mesmas condições. Hendriksen et al., (2000) utilizaram como doadoras de oócitos, fêmeas superestimuladas com eCG e com controle do pico de LH. Um dos ovários foi removido antes da indução exógena do pico de LH e os oócitos aspirados e submetidos à maturação *in vitro*. A outra ovariectomia foi realizada 20 horas após a indução do pico e os oócitos maturados *in vivo* foram recuperados. Os oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* resultaram em 52% e 32% de blastocistos, respectivamente, após fertilização e cultivo *in vitro*.

Recentemente, Dielemann et al. (2002) empregaram nas doadoras um protocolo de superestimulação e indução do pico de LH similar ao descrito por Nogueira et al. (2000), e recuperaram os oócitos através de punção folicular guiada por ultra-som. Cada vaca teve um dos ovários puncionado duas horas antes da indução e o outro após 24 horas da indução exógena do pico de LH. As taxas de clivagem e formação de embriões não foram afetadas pelos diferentes processos de maturação. Entretanto, no mesmo estudo observou-se uma maior proporção de blastocistos expandidos oriundos de oócitos maturados *in vivo*. Esses oócitos também produziram embriões com maior número de células e embriões com menores proporções de células com aberrações cromossômicas (embriões mixoplóides).

#### 4. COMO OS OÓCITOS ADQUIREM COMPETÊNCIA PARA O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO?

Visto que oócitos maturados *in vitro* não diferem significativamente daqueles maturados *in vivo* quanto à maturação nuclear, taxas de fertilização e clivagem, a diferença mais surpreendente entre esses dois tipos de oócitos é o seu potencial de desenvolvimento. Esse fato sugere solidamente maiores diferenças na maturação citoplasmática dos oócitos (HYTTEL et al., 1997).

Quando os oócitos reiniciam a meiose durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, a habilidade de produzir proteínas não é afetada porém ele perde a capacidade de sintetizar RNAs (SIRARD E COENEN, 1994; BLONDIN E SIRARD, 1995; FOULADI NASHTA et al., 1998). A plena capacidade de síntese de RNA somente será restabelecida após a ativação do genoma do embrião, durante uma fase chamada de transição materno-zigótica – MZT), que no bovino ocorre no quarto ciclo celular entra os estágios de 8 a 16 células do embrião (BREVINI GANDOLFI e GANDOLFI, 2001). O oócito é responsável por conter as instruções necessárias para dirigir as primeiras divisões zigóticas e a ativação do genoma embrionário (SIRARD, 2001). Antes da ativação do genoma do embrião, o desenvolvimento embrionário é suportado por RNAs e proteínas maternos e sintetizados durante a oogênese.

No oócito, ao contrario do que ocorre com qualquer célula somática, o intervalo entre a síntese e a utilização do RNA e moléculas protéicas pode ser de até varias semanas. Existe uma série de estratégias para o armazenamento dessas moléculas em uma forma quiescente e seu emprego no tempo certo ao longo da maturação do oócito e desenvolvimento embrionário inicial (BREVINI GANDOLFI e GANDOLFI, 2001). A eficiência de tal armazenamento, assim como a reativação oportuna das moléculas armazenadas determina a qualidade do oócito e a sua competência para o desenvolvimento embrionário.



## **5. FATORES QUE AFETAM O POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO**

### **5.1. O DIÂMETRO DO FOLÍCULO E DO OÓCITO NA COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO *IN VITRO***

Alguns estudos descrevem uma relação entre o potencial de desenvolvimento do oócito e o diâmetro do folículo (OTOI et al., 1997) o que, indiretamente, aponta para uma conexão entre o crescimento do oócito e a competência para o desenvolvimento após fertilização *in vitro* e cultivo. Yang et al. (1997) observaram taxas crescentes de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário de oócitos oriundos de folículos com diâmetros de 1 até 8mm. Essa informação corresponde aquela descrita por PAVLOCK et al. (1992), quando estes autores observaram que oócitos de folículos com 1-2mm foram ineficientes em produzir embriões *in vitro*. Lonergan et al. (1994) experimentaram melhor desenvolvimento *in vitro* de oócitos recuperados de folículos maiores que 6mm, comparados a oócitos de folículos de 2-6mm. Outros estudos não encontraram diferenças na competência de oócitos oriundos de folículos de 3-5mm ou 6-8mm (BLONDIN e SIRARD, 1995; HAGEMANN et al., 1997).Essa discrepância foi atribuída ao fato de que, naqueles estudos, folículos de 2mm estavam inclusos no grupo de pequenos folículos pois sabe-se que estes oócitos não completaram sua fase de desenvolvimento e síntese de RNA e portanto não são competentes (HENDRIKSEN et al., 2000).

A influência do diâmetro do oócito na progressão da maturação nuclear e produção de embriões *in vitro* foi bem explorada por OTOI et al. (1997) e HYTTEL et al. (1997). Os resultados descritos pelos dois grupos de pesquisadores foram bastante similares e sugerem que o oócito adquire a competência para reiniciar a meiose quando seu diâmetro atinge 110-115 $\mu$ m. Entretanto, o potencial de desenvolvimento embrionário se estabelece mais tarde quando o oócito alcança um diâmetro de 120 $\mu$ m. O crescimento do oócito e do folículo são eventos paralelos, de modo que o oócito atinge 110 $\mu$ m quando seu folículo atinge 3mm, e o diâmetro de 120 $\mu$ m para o oócito será encontrado em folículos maiores de 3mm.

## 5.2. GRAU DE DIFERENCIAÇÃO FOLICULAR E A COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DOS OÓCITOS

O grau de desenvolvimento e capacitação de um folículo tem um claro impacto na capacidade de um oócito tornar-se embrião. Geralmente, os protocolos de produção *in vitro* utilizam oócitos aspirados de folículos com diâmetro entre 2-8mm, oriundos de ovários de abatedouro ou aspiração folicular transvaginal. Entretanto, 60 a 80% daqueles selecionados não são competentes e não atingem o estágio de blastocisto (SIRARD, 2001).

O complexo cumulus-oócito é a última porção do folículo que é afetada pela atresia e, mesmo em estados avançados de atresia folicular, apenas 25% dos complexos apresentam sinais claros de degeneração (HENDRIKSEN et al., 2000). Folículos com mais de 73% de células apoptóticas ainda podem oferecer oócitos competentes (HAGEMANN et al., 1999). Estágios iniciais de atresia folicular não afetam negativamente o potencial do oócito e, pelo contrário, parecem estimular a competência do oócito para desenvolver-se (BLONDIN et al., 1997a). A competência do oócito somente será comprometida por estágios avançados de atresia (HAGEMANN et al., 1999).

A atresia é predominantemente induzida durante a fase de dominância de uma onda folicular. Hagemann et al. (1999) investigaram o efeito da dominância folicular sobre a competência dos oócitos dos folículos subordinados. As melhores taxas de produção de blastocistos foram obtidas de oócitos recuperados durante a fase de crescimento da onda folicular (dias 2 e 10 do ciclo) comparadas a de oócitos aspirados durante a fase de dominância (dias 7 e 15 do ciclo). Hendriksen et al. (2000) compararam oócitos obtidos nos dias 2, 5 e 8 da onda folicular, a qual foi induzida pela ablação de todos os folículos grandes. Os resultados indicaram uma menor competência de oócitos recuperados durante a fase mais avançada de dominância (dia 8), em relação a fase de crescimento (dia 2) ou de dominância inicial (dia 5). O sucesso da produção *in vitro* está diretamente relacionada à frequência de sessões de aspiração folicular. As melhores taxas de produção de embriões ocorrem com sessões a cada 3 ou 4 dias do que semanalmente (HANENBERG et al., 1997; GOODHAND et al., 1999), o que pode ser

atribuído à prevenção da formação de um folículo dominante pelo menor intervalo entre as sessões.

Por essas razões, o grau de diferenciação folicular desempenha um papel mais importante na competência de desenvolvimento do oócito do que outros fatores como o diâmetro folicular ou do oócito e o estado de atresia isoladamente (BLONDIN E SIRARD, 1996).

## **6. ABORDAGENS PARA ELEVAR A COMPETÊNCIA DE OÓCITOS PARA O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO***

### **6.1. SISTEMAS DE MATURAÇÃO**

Nos protocolos padrões de maturação *in vitro* caracteriza-se a adição de soro, estradiol, FSH, LH ou outros fatores com o objetivo de estimular o desenvolvimento *in vitro* (GUIXUE et al., 2001). Diversas publicações demonstraram que alguns fatores podem melhorar a competência oocitária elevando significativamente o número de blastocistos produzidos. Fatores de crescimento, gonadotrofinas, soros específicos e diferentes condições de cultivo revelaram algum efeito nas taxas de produção e qualidade embrionária, mas nunca 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 de cultivo (SIRARD, 2001).

Desse modo, a maioria dos laboratórios ainda utilizam as condições simples inicialmente propostas por Moor et al. (1984), onde o TCM-199 é suplementado com soro fetal bovino, estradiol e gonadotrofinas. Nagai et al. (2001), afirmam que é necessário entender definitivamente os mecanismos envolvidos na maturação dos oócitos, para então aplicar o conhecimento acumulado no aprimoramento dos sistemas de maturação *in vitro*.

## 6.2. INIBIÇÃO REVERSÍVEL DA MEIOSE

Há alguns anos, a busca pela maior competência de desenvolvimento do oócito está sendo focada em métodos baseados no controle do intervalo de tempo entre a aspiração do oócito e o término da sua maturação, utilizando-se da inibição temporária do reinício da meiose (SIRARD et al, 1998).

Existem diversos métodos para manter os oócitos bovinos em atraso meiótico e a maioria deles são reversíveis, mas esses métodos apenas são capazes de manter o potencial de desenvolvimento inicial (SIMON et al., 1989; SIRARD et al., 1998; LUCIANO et al., 1999; LONERGAN et al., 2000). O cultivo de folículos antrais proporcionou algum acréscimo na competência de desenvolvimento dos oócitos (FOULADI NASHTA et al., 1998) mas, à exemplo de outras condições *in vitro*, não permitem a mesma expressão de competência dos oócitos maturados *in vivo*.

## 6.3. MANIPULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

A superestimulação ovariana tem sido utilizada há vários anos para a produção *in vivo* de embriões. Com o advento da fertilização *in vitro*, protocolos de tratamento hormonal começaram a ser idealizados com o objetivo de produzir maior número de oócitos competentes para a maturação e desenvolvimento *in vitro*, Lu et al. (1991) empregaram o FSH durante dois dias, recuperando os oócitos após o abate no terceiro dia. Um discreto aumento na taxa de blastocistos foi observado nos animais tratados em relação aos não tratados. LONERGAN et al. (1994) também utilizaram um tratamento por três dias com FSH, e o abate e recuperação dos oócitos ocorreu 12 a 15 horas após a última aplicação. Apesar de um maior número de folículos observados, a taxa de desenvolvimento não foi elevada pelo tratamento hormonal.

BLONDIN et al. (1996) postularam que os oócitos deveriam originar-se de folículos sadios e realizaram um estudo onde os animais eram abatidos e os oócitos recuperados 3 a 4 horas após a última aplicação de FSH e, surpreendentemente os oócitos dos animais tratados mostraram um desenvolvimento inferior ao do grupo de animais não tratados. A competência de oócitos provenientes de ovários superestimulados foi elevada finalmente pela introdução de um intervalo de 48 horas entre o término do tratamento e a recuperação dos oócitos (BLONDIN et al., 1997b).

Atualmente a exploração comercial da fertilização *in vitro* através da aspiração folicular está sendo beneficiada pela utilização de protocolos de superestimulação. O protocolo mais amplamente utilizado consiste no emprego de doses decrescentes de FSH por três dias, a cada 12 horas, seguidos de um intervalo de 48 horas até o momento da aspiração (HANENBERG et al., 1997; GOODHAND et al., 1999; BOUSQUET et al., 1999). Este protocolo pode ser empregado semanalmente, sendo capaz de gerar 4,2 embriões transferíveis por sessão (SIRARD et al., 1999). Entretanto, a competência de desenvolvimento dos oócitos maturados *in vitro* continua aquém da observada em oócitos maturados *in vivo*.

Recentemente, Blondin et al. (2002) descreveram o emprego de um protocolo semelhante ao descrito anteriormente, porém com a inclusão de uma aplicação de LH seis horas antes da aspiração folicular. Os resultados obtidos após os procedimentos padrão de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* foram de 80%  $\pm$  0,9% de blastocistos sobre o total de oócitos recuperados. Nunca a tecnologia *in vitro* esteve tão próxima de produzir oócitos com completa competência de desenvolvimento.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas de maturação *in vitro* oferecem condições razoáveis para que o oócito desenvolva-se após fertilização e cultivo, visto que a maturação nuclear e a fertilização pelo espermatozóide não diferem substancialmente do processo *in vivo*.

A diferença no potencial de desenvolvimento entre oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* está muito mais intimamente relacionada aos eventos que antecedem a maturação final (antes do pico de LH). A síntese de RNAs e proteínas parece ser, até o momento, o fator mais importante na determinação da competência do oócito e, nos procedimentos atuais de produção *in vitro*, esta fase está sendo abreviada. Resta saber se, em um futuro próximo, será possível reproduzir *in vitro* também esta fase do desenvolvimento do oócito. Por enquanto, a manipulação do desenvolvimento folicular é a melhor estratégia para obter-se oócitos mais competentes.

Outra lacuna da literatura a ser preenchida é se os oócitos mais competentes são capazes de atenuar os problemas encontrados com embriões produzidos *in vitro* ao longo do desenvolvimento fetal e neonatal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR J.J., WOODS G.L., MIRAGAYA M.H. **et al.** Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 56, p. 745-758, 2001.
- BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J., van der HURK, R., **et al.** Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.
- BLONDIN, P., BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., **et al.** Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 38-43, 2002.
- BLONDIN, P., COENEN, K., GUIBAULT, L. A., **et al.** Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 1191-1203, 1996.
- BLONDIN, P., COENEN, K., SIRARD, M. A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, p. 1061-1075, 1997.a
- BLONDIN, P., COENEN, K., SIRARD, M. A. The time interval between. FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifers oocytes. **Theriogenology**, v. 48, p. 803-813, 1997.b
- BLONDIN, P., SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p. 54-62, 1995.
- BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., MORIN, N., **et al.** *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.
- BREVINI GANDOLFI, T. A. L., GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-1276, 2001.
- CHOI, Y.H. TAKAGI, M. KAMISHITA H., **et al.** Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p. 27-33, 1998.

DIELEMAN, S. J., HENDRIKSEN, P. J. M., VIUFF, D. et al. 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.

FAIR, T., HYTTEL, P., GREVE, T. et al., Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 503-512, 1996.

FARIN, P. W., CROSIER, A. E., FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.

FOULADI NASHTA, A. A., WADDINGTON, D., CAMPBELL, K. H. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: A comparative evaluation of antral follicle culture with others methods. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 255-262, 1998.

GOODHAND, K. L., WATT, R. G., STAINES, M. E., et al. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

GORDON, I. **Laboratory Production Of Cattle Embryo**. CAB International, University Press, Cambridge, 640p, 1994.

GREVE, T., XU, K. P., CALLESEN, H. et al. *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*. **Journal of *in vitro* fertilization and embryo transfer**. v. 4, p. 281-285, 1987.

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

HAGEMANN, L. J., BEAUMONT, S. E., BERG, M., et al. Development during sIVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 451-458, 1999.

HANENBERG, E. H. A. T., van WAGTENDONK-de LEW, A. M. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocyte collections for *in vitro* embryo production results. **Theriogenology**, v.47, p. 158, 1997. abstract



HENDRIKSEN, P. J. M., VOS, P. L. A. M., STEENWEG, W. N. M. et al. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 11-20, 2000.

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

KRUIP, T. A. M., DEN DASS, J. H. G., *In vitro* produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, p. 43-52, 1997.

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

LONERGAN, P., DINNYES, A., FAIR, T., et al. Bovine oocyte and embryo development following inhibition with butyrolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.

LONERGAN, P., MONAGHAN, P. RIZOS, D. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.

LU, K. H., SHI, D. S., JIANG, H., et al. Comparison of the development capacity of bovine oocytes from superovulated and non-stimulated heifers. **Theriogenology**, v. 35, p. 234, 1991. abstract

LUCIANO, A. M., POCAR, P., MILANESI, E. et al. Effect of different levels of intracellular cAMP on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subsequent development following *in vitro* fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 86-91, 1999.

MARQUANT LE GUIENNE, B., GÉRARD, M. SOLARI, A. et al. *In vitro* culture of bovine egg fertilized either *in vivo* or *in vitro*. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 29, p. 559-568, 1989.

MOOR, R. M., KRUIP, T. A. M., GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. **Theriogenology**, v. 21, p. 103-106, 1984.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.

NOGUEIRA, M. G. F., BARROS, B. J. P., ANDREUSSI, P. A. T., et al. Embryo recovery and pregnancy rates after delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated Nelore cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 505, 2000. abstract

OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, p. 769-774, 1997.

PAVLOK, A., LUCAS-HANN, A., NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63-67, 1992.

RICHARD, F. J., SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 22-28, 1996.

SIMON, M., JILEK, F., FULKA, J. Effect of cicloheximide upon maturation of maturation of bovine oocytes. **Reproduction , Nutrition and Development**, v. 29, p. 533-540, 1989.

SIRARD M. A., BLONDIN P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 417-426, 1996.

SIRARD M. A., FLORMAN H. M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1263, 1989.

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

SIRARD, M. A., COENEN, K. Effects of inhibition of meiotic resumption upon the subsequent development of bovine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v. 41, 255-262, 1995.

SIRARD, M. A., COENEN, K. The effect of hormones during *in vitro* meiotic inhibition with cicloheximidine on subsequent development of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 361, 1994. abstract

SIRARD, M. A., PICARD, L. DERY, M. et al. The time interval between. FSH-P administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v. 51, p. 699-709, 1999.

SIRARD, M. A., RICHARD, F., MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49 n.2, p. 483-497, 1998.

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

VAN WEZEL, I., RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

YANG, X. KUBOTA, C., SUZUKI, H. et al. Control of oocyte maturation in cows – Biological Factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482, 1998.