

GUSTAVO MENDES GOMES

MATURAÇÃO OVOCITÁRIA EM ÉGUAS

Botucatu

2003

GUSTAVO MENDES GOMES

MATURAÇÃO OVOCITÁRIA EM ÉGUAS

Monografia apresentada à disciplina Seminários de Reprodução do programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu.

Prof. Respons.: Profa. Dra. Maria Denise Lopes

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Botucatu-SP

2003

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	04
I. Introdução	05
II. Maturação Ovocitária.....	06
III. Fatores que influenciam a Maturação Ovocitária.....	11
IV. Aplicações de ovócitos maturados <i>in vitro</i>	14
V. Considerações Finais.....	16
VI. Referências Bibliográficas.....	16

LISTA DE ABREVIACOES

CCO: Complexo “ cumulus oophorus”

CP: Corpúsculo Polar

DNA: cido Dexorribonucleico

EGF: Fator de Crescimento Epidermal

EPE: Extrato de Pituitária Equina

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GC: Grânulos Corticais

HE: Hormônio Esteróide

IGF I e II: Fator de Crescimento semelhante a Insulina I e II

LH: Hormônio Luteinizante

MAPK: Proteina Quinase ativada por Mitgenos

MI: Metáfase I

MII: Metáfase II

Mos: Fator c-mos-pro ncogene

MPF: Fator Promotor de Maturação

PGF2a : Prostaglandina F2

QVG: Quebra da Vesícula Germinativa

RNA: cido Ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

VG: Vesícula Germinativa

I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das biotecnologias de reprodução assistidas voltadas para a produção e desenvolvimento de embriões eqüinos em estágios iniciais, tem sido mais vagaroso quando comparado às outras espécies de animais domésticos.

A importância de se estudar a origem, a diferenciação, a morfologia e a função do gameta feminino, é fundamental para se conhecer e estudar profundamente a biologia reprodutiva das espécies animais.

A maturação ovocítica é um passo de suma importância do qual dependem todos os estágios subsequentes do desenvolvimento embrionário. No entanto, ainda não conhecemos completamente o mecanismo fisiológico que mantém estas células estacionárias na meiose, ou o mecanismo que as faz reiniciar o processo de meiose no folículo pré-ovulatório (LANDIM-ALVARENGA, 2002)

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

Na última década, biotecnologias alternativas tem apontado para pesquisas, na produção de uma progênie de éguas selecionadas. A superovulação não tem sucesso estabilizado na égua (McCUE et al., 1993; PALMER et al., 1993), assim técnicas de produção *in vitro* tem sido exploradas como uma alternativa na produção de embriões. Porém, a espécie eqüina apresenta poucos relatos referentes aos sucessos desta técnica, tendo sido reportado o nascimento do primeiro produto de FIV em 1990 (PALMER et al, 1991).

Considerando que ovócitos eqüinos adquirem competência para fertilização *in vitro* após maturado *in vivo*, o processo de maturação ovocitária parece ser um ponto crítico na produção *in vitro* de embriões eqüinos.

Este trabalho tem como objetivo expor os eventos celulares morfológicos e bioquímicos que ocorrem durante a maturação ovocitária, bem como, citar algumas biotecnologias que possuem aplicação de ovócitos eqüinos maturados *in vitro*.

II. MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

O processo de maturação que resulta na aquisição da capacidade do ovócito ser fertilizado ocorre em duas fases. A primeira é conhecida como fase de crescimento e confere ao ovócito a capacidade de reiniciar a meiose (CRAN & MOOR, 1990). Nesta fase, ocorre a regulação da síntese de proteínas, concomitando com a formação de organelas como: mitocôndrias, ribossomos, grânulos corticais e vesículas contendo fontes energéticas, diferenciando a célula em um gameta funcional (SCHULTZ, 1986; PAYNTON & BACHVAROVA, 1990; EPPIG, 1991). O ovócito primário é ativado provavelmente por transmissão de sinais estimulatórios das células do cumulus, causando uma intensa atividade transcripcional de Ácido Ribonucleico (RNA). Desta forma, a maior parte deste RNA não é traduzido e sim estocado no citoplasma sob uma forma estável (sem a poliadenilação que é requerida para tradução). Imediatamente antes e após a fertilização ocorre a tradução das informações contidas no RNA dando suporte a finalização da meiose e ao desenvolvimento embrionário (PAYNTON & BACHVAROVA, 1990; CRAN & MOOR, 1990).

A segunda fase, caracterizada pelo reinício da meiose é normalmente denominada de maturação final e ocorre após a puberdade no folículo pré-ovulatório. Esta fase envolve modificações nucleares e citoplasmática que irão resultar na formação de um gameta com capacidade de ser fertilizado (CRAN et al., 1980; MOOR et al., 1981; SATHANANTHAN, 1994).

Em mamíferos, a maturação ovocitária é estimulada pela retirada da influencia inibitória das células foliculares. A adição de hormônios (ou remoção do ovócito do interior do folículo) é seguida por um período latente, de duração variável entre as espécies. Este período corresponde a transdução do sinal hormonal. Sendo assim, a ocorrência da maturação meiótica é acompanhada e provavelmente regulada por mudanças no padrão de fosforilação de várias proteínas celulares.

A habilidade do oócito ser fertilizado depende de uma maturação ovocitária normal, tanto nuclear (em metáfase I) quanto citoplasmática. Entende-se como maturação nuclear as mudanças que ocorrem no núcleo do ovócito, mais especificamente a duplicação e divisão do Ácido Desoxiribonucleico (DNA), onde o reinício da meiose depende de uma série de

fatores externos, marcado pela extrusão do 1º corpúsculo polar (CP) e formação da segunda placa metafásica. A maturação citoplasmática é caracterizada por diversas mudanças no formato e localização das organelas celulares. Estas estão intimamente relacionadas com a aquisição da competência meiótica e com a capacidade do ovócito de ser fecundado e de passar pelo desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 1989). A maturação nuclear pode ser facilmente identificada pela configuração cromossômica. A maturação citoplasmática, a qual é necessária no desenvolvimento pós-fertilização, é pouco avaliada (HINRICHS et al,1995).

Ghadially (1988) estabeleceu que as gotas lipídicas podem ser visualizadas na microscopia eletrônica medianamente eletrolúcidas ou podem apresentar um halo eletrolúcido em volta. Segundo o autor o halo pode ser devido a dois motivos: a composição por ácidos graxos (na sua maioria ácidos graxos insaturados) ou que as mesmas estejam sendo metabolizadas e que esta metabolização seja da periferia para o centro.

As vesículas com membrana ocupam 15% do volume do ovócito e esta porcentagem diminui com o processo de maturação citoplasmática. Elas apresentam-se como corpos eletrolúcidos com conteúdo amorfo e membranoso e em íntima relação com o retículo endoplasmático liso (GHADIALLY,1988).

Em bovinos, os trabalhos realizados com auxílio da microscopia eletrônica por Hyttel et al. (1989) demonstraram que, no ovócito imaturo, as vesículas com membrana são encontradas no citoplasma em grande número e com uma distribuição homogênea. As mitocôndrias se localizam em grupos na periferia do ovócito, assim como os grânulos corticais. Um atraso na distribuição periférica dos grânulos corticais indica incoordenação entre a maturação nuclear e citoplasmática (IZADYAR et al., 1997). Na periferia encontram-se também os complexos de Golgi bem desenvolvidos. O ovócito é intimamente associado com as células do cumulus. As células adjacentes ao ovócito (corona radiata) tem longas extensões citoplasmáticas que penetram a zona pelúcida e terminam em bulbos (junções comunicantes do tipo GAP) associados com a membrana ovocitária. A importância destas junções é permitir a passagem de substâncias de baixo peso molecular via células do cumulus (GORDON, 1994).

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

Na maturação ovocitária a quebra das relações entre o ovócito e as células da granulosa adjacentes resulta em mudanças na atividade ovocitária. Esta atividade está relacionada com um rearranjo dos compartimentos celulares e migração das organelas citoplasmáticas da periferia para a região cortical. Existe uma associação entre as mitocôndrias e o retículo endoplasmático liso (REL) formando um microambiente, facilitando a troca de metabólitos intermediários entre as duas organelas (FLEMING & SAACKER, 1972). A partir deste momento, os lipídeos estocados sob a forma de gotas lipídicas se tornam uma importante fonte de nutrientes e energia para a maturação final e fertilização do ovócito até as clivagens iniciais. O rearranjo entre estas organelas parece ser essencial na produção de adenosina trifosfato nos eventos celulares da maturação ovocitária pré-ovulatória.

As alterações na ultraestrutura que ocorrem na maturação final em bovinos são o desenvolvimento de um estoque lipídico, redução nos complexos de Golgi, alinhamento dos grânulos corticais (HYTTEL et al., 1997), aparecimento de numerosos ribossomos, especialmente nas adjacências dos cromossomos (KRUIP et al., 1983).

Na espécie equina, as relações entre as mudanças morfológicas e endocrinológicas do fluido folicular e do ovócito em maturação são pobremente descritas. Na maioria das espécies de mamíferos, a maturação nuclear *in vivo* ocorre após o pico pré-ovulatório de LH (DEKEL et al., 1988; SIRARD & FIRST, 1988; HYTTEL et al., 1989; SUN & MOOR, 1991). Na égua não existe um pico de LH pré-ovulatório precedendo a ovulação; em lugar disso, as concentrações de LH aumentam gradualmente durante o estro (GESCHWIND et al., 1975; MILLER et al., 1980).

Em folículos imaturos e pré-ovulatórios de éguas menores que 37mm (provavelmente antes do pico de LH) o núcleo do ovócito é esférico e localizado central ou periférico ao ovoplasma. O espaço perivitelino está ausente e há uma forte união entre ovócito e células do cumulus, através de numerosas junções comunicantes com o ovolema

(SZÖLLÖSI et al., 1978; MOOR et al., 1980; MOOR et al., 1981; KRUIP et al., 1983; CRAN, 1985; HYTTEL et al., 1987). As mitocôndrias estão concentradas na região cortical, e em íntimo contato com o retículo endoplasmático formando pequenas unidades metabólicas (ZAMBONI & MASTROIANNI, 1966; FLEMMING & SAAKE, 1972; CRAN et al., 1980; KRUIP et al., 1983; VOGELSANG et al., 1987). Uma segunda fase de mudanças dinâmicas é a quebra da vesícula germinativa, que depende da liberação gradual das células foliculares. No ovócito eqüino, o espaço perivitelino é marcadamente aumentado, e no seu interior ocorre a finalização dos processos de células do cumulus.

Uma descrição detalhada das modificações morfológicas que ocorrem no ovócito eqüino foi realizada por Grondahl et al. (1994), o qual utilizou microscopia eletrônica de transmissão para visualizar o processo. Os autores observaram um achatamento do núcleo esférico do ovócito eqüino, seguido de um aumento da ondulação do envelope nuclear, formação da placa metafásica da primeira divisão meiótica, e finalmente, extrusão do 1º corpúsculo polar com subsequente formação da placa metafásica da segunda divisão meiótica. De acordo com o estágio de maturação nuclear analisado por microscopia óptica, os ovócitos podem ser classificados em: VG (vesícula germinativa) – quando o ovócito apresenta um núcleo esférico localizado central ou periféricamente no ovoplasma.; QVG (quebra da vesícula germinativa) – quando o núcleo do ovócito apresenta carioteca irregular ao redor de cromatina condensada e dispersa ; MI (metáfase I) – caracterizado pela presença dos cromossomos arranjados na placa metafásica e localizados periféricamente no ovoplasma; e MII (metáfase II) – presença dos cromossomos metafásicos na periferia do ovoplasma e do corpúsculo polar no espaço perivitelinico

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

Willis et al. (1994) trabalhando com ovócitos imaturos e maturados *in vitro* de eqüinos por 15 horas, descreveram que, enquanto o ovócito imaturo apresenta poucos

grânulos corticais e poucas microvilosidades, no ovócito maturo os grânulos corticais apresentam-se esféricos, com forma e tamanho homogêneos, densos e migram até a membrana citoplasmática.

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

A principal característica dos ovócitos de eqüinos independente do seu estado de maturação nuclear é a presença de uma grande quantidade de gotas de lipídeo em associação com mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, apresentando conteúdo amorfo de densidade eletrônica média, sugerindo a formação de unidades metabólicas (FLEMMING & SAACKE, 1972, KRUIP et al., 1983). De fato a observação de algumas gotas sem o conteúdo amorfo e apresentando restos de membrana indica a metabolização do material neles contido, provavelmente colesterol. A aparência diferente do conteúdo presente nos ovócitos maturos, nos quais as gotas parecem vazias e a associação menos consistente com as mitocôndrias, parece indicar que o processo de maturação demanda a metabolização do conteúdo desta gotas (LANDIM-ALVARENGA, 2002).

Estudos relatam sobre o envolvimento do retículo endoplasmático liso no metabolismo lipídico (ALBERTS, 1989). Esta observação morfológica citada anteriormente pode indicar que, ovócitos e/ou embriões de eqüinos tem a capacidade de sintetizar colesterol. De fato, embriões de eqüinos são capazes de produzir estrógeno durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento (GINTHER, 1992).

Tanto nos ovócitos maturos quanto imaturos foi observada a presença de complexos de golgi localizado na periferia próximo ao ovolema. Entretanto, nos ovócitos imaturos, fixados logo após a colheita, o complexo de golgi apresentou-se mais desenvolvido, constituído por inúmeras lamelas dilatadas associadas a vesículas membranosas de eletrodensidade variável. Nos ovócitos maturos, o complexo de Golgi também presente na

periferia do ovócito, mas com tamanho reduzido indicando menor atividade, o que poderia ser explicado por já ter concluído a produção de grânulos corticais (LANDIM-ALVARENGA 2002).

Nos ovócitos maduros as junções celulares comunicantes do tipo GAP deixaram de ser observadas. De acordo com Odor (1960), no folículo pré-ovulatório de rato, os processos das células da granulosa começam a se retrair, e no momento da formação do 1º corpúsculo polar o espaço periviteliníco se encontra aumentado, não sendo mais observadas junções celulares entre as células somáticas e o ovócito. Em mamíferos, a dissociação progressiva das células do cumulus do ovócito ocorre em resposta ao estímulo gonadotrófica durante o período pré-ovulatório (GILULA et al., 1978). Aparentemente esta perda de contato é importante para a finalização da maturação citoplasmática e preparação para a fertilização (EPPIG & DOWNS, 1987).

III. FATORES QUE INFLUENCIAM A MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

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

Nos protocolos padrões de maturação *in vitro* caracteriza-se a adição de soro, estradiol, FSH, LH ou outros fatores, os responsáveis pelo estímulo de desenvolvimento *in vitro* do ovócito (GUIXUE et al., 2001). Estudos demonstraram que alguns fatores podem melhorar a competência oocitária elevando significativamente o número de blastocistos produzidos *in vitro*. Fatores de crescimento, gonadotrofinas, soro específicos e diferentes condições de cultivo revelaram influência nas taxas de produção e qualidade embrionária, porém, ainda não se tem relato sobre uma resposta total dos ovócitos cultivados nestas condições (SIRARD et al., 1998). Apesar de sabermos da influência dos meios e condições

de cultivo, são os próprios constituintes originais do oócito que são os responsáveis por controlar a habilidade de responder as condições mais adequadas de cultivo (SIRARD, 2001).

Desse modo, a maioria dos laboratórios ainda utilizam as condições inicialmente propostas por Moor et al. (1984), onde o meio de cultivo celular TCM-199 é suplementado com soro fetal bovino, estradiol e gonadotrofinas.

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

Muitos trabalhos sugerem que o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) tenha um efeito benéfico e que a presença de gonadotrofinas melhore a expansão das células do cumulus, e conseqüentemente leve à melhoras na capacitação espermática e na fertilização. (EYESTONE & BOER, 1993).

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

Um componente importante é a atividade do fator promotor de maturação (MPF) (MASUI & MARKERT, 1971), o qual acredita-se ser um regulador universal do ciclo celular, tanto na mitose como meiose (NURSE, 1990). O MPF é uma proteína composta por uma subunidade catalítica, a cinase 1 ciclina dependente (cdk1, também conhecida por p34^{cdc2}) e uma subunidade reguladora, a ciclina B (DOWNS, 1993; TAIEB et al., 1997). O MPF ativo induz a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do envelope nuclear (QVG) e a reorganização do citoplasma para entrada na fase M (divisão) tanto do ciclo mitótico como meiótico (MURRAY, 1989; MURRAY & KIRSCHNER, 1989). Em

ovócitos de vertebrados, o fuso da meiose I se organiza, e leva à divisão desigual correspondente a expulsão do primeiro corpúsculo polar, em paralelo com um decréscimo na atividade do MPF. A atividade do MPF aumenta novamente, induzindo a formação imediata do fuso da segunda divisão meiótica, sem a reorganização do envelope nuclear, descondensação dos cromossomos e replicação de DNA. Os ovócitos ficam então parados no estágio de metáfase II, com altos níveis de MPF até o momento da fertilização (HASHIMOTO & KISHIMOTO, 1988; CHOI et al., 1991; NAITO & TOYODA, 1991; JELINKOVA et al., 1994; DEDIEU et al., 1996; TAIEB et al., 1997; WU et al., 1997). Outras kinases também estão envolvidas na regulação dos eventos meióticos, como a proteína-kinase MAP (mitogen-activated protein kinase).

O produto do fator c-mos proto-oncogene (MOS) é a chave reguladora da maturação ovocítica em diferentes espécies, e sua tradução representa um exemplo clássico de como a expressão dos genes pode ser regulada pela poliadenilação citoplasmática do RNA mensageiro (RNAm) (RICHTER, 1996). MOS é o produto de um RNAm materno estocado no citoplasma durante a fase de crescimento ovocítica. Ele é traduzido durante a maturação e degradado junto com muitos outros RNAs em estágios posteriores de desenvolvimento (PARIS & RICHTER, 1990; GEBAUER et al., 1994). O produto MOS tem a habilidade de ativar a cascata de quinases proteicas ativadas por mitógenos (MAP), que media a atividade do MPF. O MOS pode atuar diferentemente nos estágios de desenvolvimento, podendo comportar-se como ativador na metáfase I e como inibidor na metáfase II, dependendo das estruturas e da bioquímica em contexto (GALLICANO et al., 1997). Hoje está claro que a distribuição do RNAm no citoplasma ovocítico não é uniforme e que a assimetria é necessária para o funcionamento celular normal (ST. JOHNSTON, 1995).

Existem fatores de crescimento produzidos nos ovários que estão envolvidos na regulação da maturação nuclear e na expansão do cumulus. Os fatores crescimento relacionados com a maturação ovocitária são o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento semelhante a Insulina I e II, (Insulin like factor I e II / IGF-I e IGF-II), TGF α e TGF β . O EGF reduz a atividade da adenilato ciclase e aumenta a atividade da fosfodiesterase, diminuindo assim os níveis de AMP cíclico nas células da granulosa, o que impede a indução de receptores para o LH pelo FSH (TSAFARI & ADASHI, 1994).

Estudos realizados com camundongos demonstram que o EGF estimula a QVG em ovócitos e induz a expansão do cumulus oophorus (BUCCIONE et al., 1990). O EGF pode atuar como regulador intra-ovariano da maturação em resposta ao estímulo da gonadotrofina (ROY & GREENWALD, 1990) e desempenhar um papel na cascata bioquímica envolvida no ciclo meiótico, levando a ativação da Proteína Quinase Mitógeno Ativada (MAPK).

Em bovinos, Lorenzo et al. (1994) observaram que o EGF atua estimulando a maturação do Complexo Cumulus Ovócito (CCO), mas não atua, em ovócitos desnudados (sem células do cumulus).

Quanto ao IGF-I, receptores foram detectados tanto no ovócito quanto nas células do cumulus, e já foi demonstrado previamente (ADASHI et al., 1985; XIA et al., 1994; MAY et al., 1988) que o IGF-I modula uma variedade de funções das células foliculares somáticas como a proliferação, diferenciação e a esteroidogênese. Pesquisas mostraram que a expansão das células do cumulus ocorre por influência deste fator de crescimento, e que o IGF-I possa ser produzido endogenamente pelos CCOs (SINGH & ARMSTRONG, 1997).

As razões para a falha dos ovócitos eqüinos em completar a meiose durante a maturação *in vitro* são desconhecidas, mas podem estar ligadas a uma alteração da cascata bioquímica envolvida na meiose (GOUDET et al., 1998). As duas subunidades da MPF, P34^{cdc2} e ciclina B e MAPK estão presentes nos eqüinos nos estágios de ovócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*, competentes e incompetentes (GOUDET et al., 1998). Portanto acredita-se que a falha dos ovócitos eqüinos em completar a meiose não seja pela ausência destas proteínas e sim, por uma deficiência de reguladores de MPF e/ou uma inabilidade de fosforilar a MAPK.

IV. APLICAÇÕES DE OVÓCITOS MATURADOS IN VITRO

Algumas técnicas estão sendo desenvolvidas no intuito de se obter um maior número de embriões e com isso aumentar o número de descendentes provenientes de animais de alto potencial genético. Porém, a espécie eqüina possui algumas particularidades que impossibilitam bons resultados ao utilizar determinadas biotécnicas

como o caso da superovulação, fato este causado, por uma insensibilidade de égua em responder a estímulos superovulatórios ao utilizar preparações comerciais de hormônios que normalmente funcionam bem, nas outras espécies de animais domésticos (SQUIRES et al., 1986).

O primeiro caprino resultante de fertilização *in vitro* (FIV) nasceu em 1981 (BRACETT et al., 1982) e em bovino, a FIV hoje em dia, é utilizada como um importante instrumento de estudos de maturação oocitária, fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário. Em contraste, a espécie equina apresenta poucos relatos referentes aos sucessos desta técnica, tendo sido reportado o nascimento do primeiro produto de FIV em 1990 (PALMER et al., 1991).

A produção *in vitro* de embriões tem sido uma alternativa para aumentar o número de descendentes de um indivíduo, porém, devido ao fato dos resultados de FIV em equinos serem muito ruins, outras biotécnicas estão sendo desenvolvidas como a transferência de ovócito (OT) e a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT). Ambas as técnicas, possuem em seus protocolos, a maturação ovocitária em duas fases (*in vivo* e *in vitro*) e a fertilização *in vivo* (CARNEVALE et al., 2000).

Estas técnicas estão sendo desenvolvidas em reprodução assistida com intuito de obter-se prenhez de éguas de idade avançada ou de éguas que apresentem lesões presente no trato reprodutivo, como: patologias tubáricas e uterinas, lesões iatrogênicas após coleta, baixa índice de recuperação embrionária, ou seja patologias extragonadais. Nestas técnicas, a recuperação do ovócito se faz por punção folicular aspirativa, sendo o ovócito transferido cirurgicamente através de laparotomia para o oviduto (CARNEVALE et al., 2000, COUTINHO DA SILVA et al., 2002).

Outro intuito de utilização da técnica de aspiração folicular, é de se obter oócitos para estudos de fisiologia reprodutiva (maturação ovocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário) como realizado por alguns autores (HINRICHS & DIGIORGIO, 1991; CARNEVALE & GINTHER, 1995).

Uma técnica promissora para talvez se obter prenhez de éguas problemas, seria a transferência intrafolicular de ovócitos, que consiste em aspirar o ovócito e transferi-lo para um folículo pré-ovulatório de uma segunda fêmea, no intuito de se obter maturação ovocitária, ovulação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vivo*. Hinrichs &

DiGiorgio (1991) confirmaram ser possível a produção de mais de um embrião por égua quando da transferência de ovócitos intrafolicular, utilizando ovócitos provenientes de matadouro. Esta técnica também foi utilizada em bovinos (BERGFELT et al., 1998), sendo observados múltiplos ovócitos e embriões após 2 a 3 dias de ovulação, no interior do oviduto das vacas que foram utilizadas como receptoras de ovócito intrafolicular.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da fisiologia reprodutiva é um dos desafios mais empolgantes a serem desvendados. Sabe-se que ao se entender as modificações morfofisiológicas ocorridas *in vivo* nos animais, estaremos dando um enorme passo para conseguirmos aplicar de uma maneira mais adequada biotecnologias na reprodução dos animais domésticos.

Pouco se sabe sobre a reprodução assistida na espécie equina referente às biotecnologias voltadas para estudo de produção e desenvolvimento de embriões em estágios iniciais (principalmente FIV), pois os estudos e as descobertas nesta espécie especificamente, têm sido mais vagarosos quando comparados às outras espécies de animais domésticos.

A importância de se estudar a origem, a diferenciação, a morfologia e a função do gameta feminino, é fundamental para se conhecer e estudar profundamente a biologia reprodutiva das espécies animais.

Para que sejam obtidos progressos na produção *in vitro* de embriões equinos, muito ainda deve ser pesquisado na tentativa de entender os aspectos fisiológicos envolvidos na maturação ovocítica e na capacitação espermática.

Muitas biotécnicas estão sendo sugeridas e desenvolvidas para equinos, na espera, que estudiosos consigam desvendar os desafios da FIV e da superovulação.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASHI, E. Y.; et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr. Rev.* v. 6, p. 400-420, 1985.

ALBERTS, B.; et al. The Endoplasmic Reticulum. In: *Molecular Biology of the Cell*. 2ªed, Garland Publishin, Inc. New York. P. 433-450, 1989.

- BERGFELT, D.R., BROGLIATTI, G.M., ADAMS, G.P. Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. *Theriogenology*, v. 50, p. 15-25, 1998.
- BRACKETT, B.G.; et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, v.27, p.147-158, 1982.
- BRACKETT, B. G.; YOUNIS, A I.; FAYER-HOSKEN, R. A Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility*, v. 52, p. 319-324, 1989.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A; EPPIG, J. Interactions between somatics cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.*, v. 43, p. 543-547, 1990.
- BUEHR, M. Oogenesis. In: HYTTEL, P., *Embryotechnology – cell biological and applied aspects*. Copenhagen: Summerschool preceedings RVAU, 1994. p. 3.
- CARNEIRO, G., F.; et al. Equine oocyte cortical granules: description and quantification during *in vitro* maturation and after activation. *Theriogenology*, v. 57, p. 363, 2002.
- CARNEVALE, E.M.; et al. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology*, v.54, p.981-87, 2000.
- CARNEVALE, E.M., GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono 1*, p.209-214, 1995.
- CHOI, T.; et al. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development*, v. 113, p. 789-795, 1991.
- COUTINHO DA SILVA, M.A.; et al. Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.1275-1279, 2002.
- CRAN, D. G.; MOOR, R. M. Programming the oocyte for fertilization. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E.R.S. *Fertilization in mammals*. Norwell: Serono Symposia, 1990. P. 35-50.
- CRAN D. G.; MOOR, R. M.; HAY, M. F. Fine struture of the sheep oocyte during antral follicle development. *J. Reprod. Fertil.*, v. 59, p. 125-132, 1980.
- DEDIEU, T.; et al. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 45, p. 351-358, 1996.
- DEKEL, N.; GALIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. *Biol. Reprod.*, v. 38, p. 517-521, 1988.
- DOWNS, S. M. The maintenance of meiotic arrest in mammalian oocytes. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. *Fertilization in mammals*. Norwell: Serono Symposia, 1990, p. 5-16.
- DOWNS, S. M. Factors affeting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, v. 39, p. 65-79, 1993.

- ENDERS, A C.; et al. The ovulated ovum of the horse: cytology of nonfertilized ova to pronuclear stage ova. *Biol. Reprod.*, v. 37, p. 453-466, 1987.
- EPPIG, J. J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from antral follicles. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 824-830, 1991
- EPPIG, J. J.; DOWNS, S. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development *in vitro*: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev. Biol.*, v. 119, p. 313-321, 1987.
- EYESTONE, W. H.; BOER, H. A FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology*, v. 39, p. 216, 1993.
- FLEMMING, W. N.; SAACKE, R. G. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. *J. Reprod. Fertil.*, v. 29, p. 203-213, 1972.
- FRANZ, L., C.; et al. Effect of time and temperature during transport of ovaries on nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes. *Theriogenology*, v. 57, p.718, 2002.
- GALLICANO, G. I.; et al. PKC: a pivotal regulator of early development. *Bioessays*, v. 19, p. 29-36, 1997.
- GEBAUER, R. L.; et al. Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-Mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. *EMBO J.*, v. 13, p. 5712-5720, 1994.
- GESCHWIND, H.; DEWEY, R.; HUGHES, J. P. Plasma LH levels in the mare during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fert.*, v. 23, p. 207-212, 1975.
- GHADIALLY, F. N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. In: *Cytoplasmic matrix and its inclusions*, London: Butterworths, 1988. cap. 13. P. 953-1042.
- GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell Biol.*, v. 78, p. 58-75, 1978.
- GINTHER, O J. Maternal aspects of pregnancy. In: *Reproductive Biology of the Mare, basic and applied aspects*. 2^o ed. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, p. 173-344, 1992.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International, 1994. P. 645-663. ISBN 0 85198 928 4.
- GOUDET, G.; et al. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. *Molecular Human Reproduction*, v. 4, p. 563-570, 1998.
- GRONDAHL, C.; et al. RNA synthesis and ultrastructure of equine zygotes and embryos. *Theriogenology*, V. 41, p. 209, 1994.

- 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.
- HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.*, v. 126, p. 242-252, 1988.
- HINRICHS, K.; et al. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 104, p. 149-156, 1995.
- HINRICHS, K., DIGIORGIO, L.M. Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, v.44, p.369-374, 1991.
- HYTTEL, P.; et al. Oocyte growth, capitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 23-32, 1997.
- HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fert.*, v. 38, p. 35-47, 1989.
- HYTTEL, P.; et al. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Anat. Embryol.*, v. 176, p. 35-40, 1987.
- IZADYAR, F.; et al. The effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. In: IZADYAR, F. *Regulation of bovine oocyte maturation-The role of activin and growth hormone*. Wijk dij Duurstede: ADDIX, 1997. cap.5. p. 65-83.
- JELINKOVA, L.; et al. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* V. 37, p. 210-215, 1994.
- KENNEDY, J. F.; DONAHUE, R. P. Human oocytes: maturation in chemically defined media. *Science*, v. 164, p. 1292-1293, 1969.
- KRUIP, T. A M.; et al. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Research*, v. 8, p. 29-47, 1983.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C. *Estudo da maturação nuclear, ultraestrutura e fertilização xenogênica de ovócitos equinos maturados in vitro*. 2002. 180p.Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu.
- LORENZO, P. L.; et al. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fertil.* v. 101, p. 697-701, 1994.
- MASUI, Y.; MARKERT, C. L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, v. 177, p. 129-146, 1971.
- MAY, J. V.; FROST, J. P.; SCHOMBERG, D. W. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor- β on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology*, v. 123, p. 168-179, 1988.

- McCUE, P. M.; HUGHES, J. P.; LASLEY, B. L. Effects on ovulation rate of passive immunisation of mares against inhibin. *Equine Vet. J.*, v. 15, p. 103-106, 1993.
- MILLER, K. F.; BERG, S. L.; SHARP, D. C. Concentrations of circulating gonadotrophins during various reproductive states in the mare. *Biol. Reprod.*, v. 22, p. 744-750, 1980.
- MOOR, R.M.; KRUIP, T.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology*, v.21, p. 103-106, 1984.
- MOOR, M. R.; et al. Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 61, p. 347-365, 1981.
- MOOR, M. R.; POLGE, C.; WILLADSEN, S. M. Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 56, p. 319-335, 1980.
- MURRAY, A W. The cell cycle as a cdc2 cycle. *Nature*, v. 342, p. 14-15, 1989.
- MURRAY, A W.; KIRSCHNER, M. W. Domineos and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, v. 246, p. 614-621, 1989.
- NAITO, K.; TOYODA, Y. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v. 93, p. 467-473, 1991.
- NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, v. 344, p. 503-508, 1990.
- ODOR, L. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. *J. Biophysical and biochemical cytology*, v. 7, p. 567-574, 1960.
- PALMER, E.; HAJMELI, G.; DUCHAMP, G. Gonadotrophin treatments increase ovulation rate of passive, but not embryo production from mares. *Equine Vet. J.*, suplemento: 15, p. 99-102, 1993.
- PALMER, E.; et al. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, v.44, 1991.
- PALMER, E.; et al. Gestation après fécondation *in vitro* dans l'espèce équine. *C. R. Acad. Sci. Paris*, v. 310, p. 71-74, 1990.
- PARIS, J. & RICHTER, J. D. Maturation-specific polyadenylation and translation control: diversity of cytoplasmic polyadenylation elements, influence of poly(A) tail size, and formation of stable polyadenylation complexes. *Mol. Cell Biol.*, v.10, p.5634-5645, 1990.
- PAYNTON, B. V.; BACHVAROVA, R. Changes in maternal RNAs during oocyte maturation. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. *Fertilization in mammals*. Norwell: Serono Symposia, 1990. P. 25-34.
- RICHTER, J. D. Dynamics of Poly (A) addition and removal during develop, emt. In: HERSHEY, J. W. B.; MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N. *Translational Control*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York. P. 481-503, 1996.

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

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

SINGH, B.; ARMSTRONG, D. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 1370-1375, 1997.

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

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

SIRARD, M. A; FIRST, N. L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* v. 39, p. 229-234, 1988.

SQUIRES, E. L; et al. Comparison of equine pituitary extract and fsh-p for superovulating mares. *Theriogenology*, v.26, p.661-670, 1986.

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

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

SZÖLLÖSI, D.; et al. Permeability of the ovarian follicle; corona cell-oocyte relationship in mammals. *Ann. Biol. Anim. Biophys.*, v. 18, p. 511-521, 1978.

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

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

TSAFRIRI, A; et al. A *In vitro* induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E2. *J. Reprod. Fertil.*, v. 31, p. 39-50, 1972.

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

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

WU, B.; et al. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v. 56, p. 253-259, 1997.

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

YAMAUCHI, N.; et al. Effects of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes. *Theriogenology*, 52: 153-162, 1999.

ZAMBONI, L.; MASTROIANNI, Jr. L. Electron microscopic studies on rabbit ova II. The penetrated tubal ovum. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 14, p. 118-132, 1966.

ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus inclosed bovine oocytes matured *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 46, suppl: 1, p. 117, 1992.

ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell inclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormonal. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 815-820, 1993.