



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**MATURAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQUÍNOS INCUBADOS EM
MEIO CONTENDO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I**

BRUNA DA ROSA CURCIO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas, sob a
orientação do Prof. João Carlos
Deschamps e Co-orientação do Prof.
Carlos Eduardo W. Nogueira como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Veterinária, Área
de Concentração: Reprodução Animal,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências (MS).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Janeiro de 2005**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**MATURAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQUÍNOS INCUBADOS EM
MEIO CONTENDO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I**

BRUNA DA ROSA CURCIO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas, sob a
orientação do Prof. João Carlos
Deschamps e Co-orientação do Prof.
Carlos Eduardo W. Nogueira como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Veterinária, Área
de Concentração: Reprodução Animal,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências (MS).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Janeiro de 2005**

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

C977m Curcio, Bruna da Rosa

Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I / Bruna da Rosa Curcio ; orientador Carlos Eduardo W. Nogueira . – Pelotas, 2005. – 63 f. : il. Dissertação (Mestrado). Reprodução Animal. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas,. Pelotas, 2005.

1. Eqüino 2. Oócitos 3. Maturação *in vitro*
4. Vitrificação. 5. Copolímero PVA 6. Microscopia confocal I .Deschamps, João Carlos (orientador)
II .Título.

BRUNA DA ROSA CURCIO

**MATURAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQÜINOS INCUBADOS EM
MEIO CONTENDO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas, sob a
orientação do Prof. João Carlos
Deschamps e Co-orientação do Prof.
Carlos Eduardo W. Nogueira como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Veterinária, Área
de Concentração: Reprodução Animal,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências (MS).

APROVADA: 03 de fevereiro de 2005.

Dra. Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro
EMBRAPA Clima Temperado

Prof^a. Dra. Maria Gabriela Tavares Rheingantz
Depto. de Morfologia – Instituto de Biologia
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira
Depto. de Clínicas Veterinárias – Faculdade de Veterinária
Universidade Federal de Pelotas
Co-orientador

Prof. PhD. João Carlos Deschamps
Depto. de Patologia Animal – Faculdade de Veterinária
Universidade Federal de Pelotas
Orientador

A receita para a ignorância é:
Satisfazer-se com suas opiniões e
contentar-se com seu conhecimento.

Elbert Hubbard

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nos permitir um novo amanhecer a cada dia.

Ao meu orientador João Carlos Deschamps, principalmente pela confiança e apoio depositados durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu Co-orientador Carlos E. Nogueira, por ter me mostrado o caminho extremamente prazeroso do trabalho com eqüinos. Pela sinceridade, amizade e apoio incondicionais, o que não me deixou desistir nos momentos mais difíceis.

Ao Méd. Vet. Gabriel Ribas Pereira pela confiança depositada, e total apoio à realização deste trabalho, principalmente no envio de material para o desenvolvimento das atividades propostas.

Aos meus colegas de Pós-graduação Carina Moraes e Friedrich Frey Júnior pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos juntos durante essa fase.

Ao colega Milton Macedo Jr pelo grande auxílio prestado e experiência transmitida, principalmente na fase inicial de desenvolvimento do projeto.

A minha incansável e “bem humorada” equipe de trabalho pela dedicação demonstrada durante o desenvolvimento do trabalho, sem eles não seria possível à conclusão dos experimentos. Agradeço sinceramente o esforço dos acadêmicos André Boff, Cleonice Fabiane, Fernanda Xavier, Gissele Rambo, Mariana Heineck e Priscila De Leon. Agradeço ainda a colaboração dos acadêmicos Alexandre Rosa e Eduardo Xavier.

A minha família por ter me ensinado os verdadeiros valores da vida, pelo apoio, carinho e confiança sempre presentes.

E finalmente, e sem dúvida, o mais importante agradecimento! Agradeço ao meu amado companheiro Rodrigo, pelo incansável apoio durante essa fase da minha vida. Desde a compreensão nos momentos mais difíceis, o auxílio nas mais diversas tarefas durante o desenvolvimento do experimento, até as árduas correções realizadas na confecção da presente dissertação.

ÍNDICE

	Página
SUMÁRIO.....	viii
SUMMARY.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	04
OOGÊNESE.....	04
FOLICULOGÊNESE.....	05
MATURAÇÃO <i>in vivo</i>	09
MATURAÇÃO <i>in vitro</i>	12
FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I....	20
HORMÔNIO DO CRESCIMENTO.....	21
VITRIFICAÇÃO.....	23
MATURAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQÜINOS INCUBADOS EM MEIO CONTENDO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I.....	28
Resumo.....	29
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	32
Resultados.....	36
Discussão.....	37
Referências Bibliográficas.....	39
CONCLUSÕES GERAIS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

SUMÁRIO

CURCIO, BRUNA DA ROSA. Universidade Federal de Pelotas, janeiro de 2005. **Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I.** Professor Orientador: PhD João Carlos Deschamps. Professor Co-orientador: Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira.

O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da adição de hormônio do crescimento eqüino (eGH), fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I) e associação de ambos na maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. Além de analisar a integridade estrutural de oócitos maturados e vitrificados em presença de copolímero PVA. Complexos *cumulus oophorus* compactos (COC) foram cultivados em TCM199 suplementado com 0,1% BSA e antibióticos. COC's (n=122) foram divididos em quatro tratamentos: 1) Controle, sem adição de hormônios (n=34); 2) 400ng/ml eGH (n=31); 3) 200ng/ml IGF-I (n= 35) e 4) 400ng/ml eGH + 200ng/ml IGF-I (n=22). Após a maturação de 30h, os oócitos foram fixados (n=37) ou submetidos a vitrificação (n=85). Os oócitos criopreservados foram expostos a 1,4 M dimetilsulfóxido (DMSO), 1,8 M etilenoglicol (EG) e 1% copolímero PVA (20% vinil acetato e 80% vinil álcool) por 3 min, transferidos para TCM com 2,8 M DMSO + 3,6 M EG + 0,6 M sacarose + 1% copolímero PVA por 1 min e envasados em palhetas abertas estendidas (OPS). As palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio por 3 segundos e imersas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os oócitos foram transferidos para PBS com concentrações decrescentes de sacarose: 0,5M, 0,25M, 0,125M e PBS com 0,4% BSA; permanecendo 5 minutos em

cada solução. A avaliação da maturação nuclear e citoplasmática foi realizada por microscopia confocal a laser. Os índices de maturação oocitária foram 26,1% grupo controle, 23,5% eGH, 31,8% IGF-I e 17,6% eGH + IGF-I, não sendo detectada diferença entre os grupos ($p>0,05$). Contudo o índice de retomada da meiose (MI+MII) no grupo com associação dos hormônios foi de 86,7%, sugerindo que a utilização de eGH e IGF-I poderia incrementar esse índice. Não foram observadas alterações morfológicas nos oócitos vitrificados/descongelados. Pode-se concluir, que não houve diferença no índice de maturação nuclear e citoplasmático com a adição de eGH, IGF-I e associação de ambos. A vitrificação com utilização de copolímeros PVA mostrou-se viável para a criopreservação de oócitos da espécie eqüina, os quais permaneceram com membrana plasmática íntegra, não ocorrendo vacuolização e degeneração celular. Este é o primeiro trabalho que descreve a utilização de copolímeros PVA na vitrificação de oócitos eqüinos.

SUMMARY

CURCIO, BRUNA DA ROSA. Federal University of Pelotas, January 2005.
Maturation and Vitrification of equine oocytes in medium with equine growth hormone and insulin-like growth factor-I. Adviser: João Carlos Deschamps. Committee: Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira.

The objective of this study was to investigate the effects of equine growth hormone (eGH) and its relationship with insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the *in vitro* maturation (IVM) and development of equine oocytes. Additionally, we also evaluated the morphological and structural integrity of all equine oocytes subjected to IVM and cryopreservation. Complex *cumulus oocytes* (COCs) were cultured in TCM199 supplemented with 0.1% BSA and antibiotics. COC's (n=122) were placed in a four-well dish supplemented according to four treatments, as follows: a) control, no additives (n=34); b) 400 ng/mL of eGH (n=31); c) 200 ng/mL of IGF-1 (n=35); and d) 400 ng/mL of eGH + 200 ng/mL of IGF-1 (n=22). After maturation, oocytes were fixed (n=37) or subjected to the vitrification protocol (n=85). Cryopreserved oocytes were exposed to 1,4 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + 1,8 M ethylene glycol (EG) + 1% PVA copolymer (20% vinyl acetate and 80% vinyl alcohol) for 3 min, and then transfer to 2,8 M DMSO + 3,6 M EG + 0,6 M sucrose + 1% PVA copolymer for 30 sec. Next, the oocytes were loaded to the open pulled straw and transferred to liquid nitrogen vapor, then held in vapor for 3 sec before being plunged into liquid nitrogen. After cryopreservation, the oocytes were thawed and transferred into a PBS containing a decreasing sucrose concentration, for 5 min of each concentration: 0.5M, 0.25M, 0.125M and PBS with 0.4% BSA. Nuclear and cytoplasmic

maturation status were assessed by laser scanning confocal microscopy. Maturation rates of oocytes were 26.1% control, 23.5% eGH, 31.8% IGF-I and 17.6% eGH + IGF-I, weren't significant difference among the treatment groups ($p>0,05$). However, the results suggest that the eGH + IGF-1 group can develop the assessment resumption of meiosis (MI+MII=86,7%). There weren't morphological abnormalities after vitrification/thawing. In conclusion, the addition of eGH and/or IGF-I to our IVM protocol didn't increase rates of nuclear and cytoplasmic maturation. Oocytes subject to vitrification with copolymer PVA had an intact plasma membrane and didn't show any sign of vacuolization or degeneration. This is the first report showing the vitrification with PVA in equine oocytes.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o terceiro maior rebanho eqüino do mundo, com um plantel de 5,9 milhões de animais, ficando atrás apenas da China com 8,2 milhões e do México com 6,2 milhões, segundo a Food and Agriculture Organization - FAO 2002 (CNA, 2003). No país, a eqüinocultura é responsável por 1,2 milhões de empregos, ocupando diretamente mais de 500 mil pessoas. Embora o potencial econômico seja pouco conhecido, essa atividade forma hoje uma importante interação dos setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo uma das cadeias produtivas que oferece mais oportunidades de trabalho, conquistando posição de destaque na economia nacional. A capacidade dos criadores em produzirem animais de qualidade, com visão mercadológica, incrementa a perspectiva de crescimento desse segmento da pecuária. Um exemplo é a exportação brasileira de eqüinos puro-sangue árabe, que ocupa 2º lugar no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (CNA, 2003).

A espécie eqüina é um modelo para a utilização dos crescentes avanços das biotécnicas, visto que a aplicação das mesmas incrementa os índices reprodutivos e, quando utilizada em animais de alto valor zootécnico, contribui para o crescimento econômico da eqüinocultura.

A inseminação artificial, a coleta e a transferência de embriões são utilizadas na eqüinocultura, porém técnicas como a superovulação de éguas, congelamento de embriões, fertilização *in vitro* (FIV), transferência de oócitos, transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e congelamento de oócitos, são

consideradas tecnologias emergentes. Contudo, são técnicas ideais para a utilização em éguas de performance (hipismo, pólo, adestramento, provas de rédeas, entre outras) e, éguas velhas de alto valor, que não possuam bons históricos reprodutivos e capacidade de levar uma gestação a termo.

Apesar da maturação *in vitro* (MIV) e FIV serem biotécnicas usuais na espécie humana e em diversas espécies domésticas, pouco sucesso tem sido alcançado na espécie eqüina (Carneiro, 2002). Apenas dois potros foram produzidos por FIV convencional, ambos resultado da fertilização de oócitos maturados *in vivo* (Squires *et al.*, 2003).

As maiores barreiras para atingir o sucesso na FIV em eqüinos, são o pouco conhecimento sobre sistemas de maturação e cultivo embrionário *in vitro*, assim como a padronização de uma técnica eficiente de capacitação espermática *in vitro* (Squires, 1996; Carneiro, 2002; Hinrichs *et al.*, 2002; Squires *et al.*, 2003).

A criopreservação de oócitos é uma das tecnologias com aplicabilidade mais pertinente, pois possibilita a preservação do material genético de éguas de elite que venham a óbito de forma repentina ou que necessitem ser submetidas à eutanásia (Squires *et al.*, 2003) e ainda, para a preservação de espécies eqüinas ameaçadas de extinção (Dell'aquila *et al.*, 1997). A vitrificação é uma técnica de criopreservação que minimiza as lesões produzidas pela queda da temperatura, possui ainda a vantagem de evitar a formação de cristais de gelo no interior das mesmas (Hochi *et al.*, 1996).

Pouco sucesso tem sido obtido na vitrificação de oócitos eqüinos. Até o presente momento há apenas uma descrição de prenhes após a transferência de oócitos vitrificados/descongelados, sendo que os mesmos foram colhidos de folículos pré-ovulatórios (Maclellan *et al.*, 2002).

Uma limitante para as pesquisas de MIV, FIV e criopreservação de oócitos eqüinos, citada universalmente nos trabalhos, é o escasso número de abatedouros especializados nessa espécie, existentes no mundo.

O desenvolvimento do presente trabalho é estratégico no sentido de aproveitamento das potencialidades locais; devido à presença do abatedouro de eqüinos na cidade de Pelotas e proximidade da região da campanha, sede de vários haras importantes com material genético de elite na espécie eqüina.

A realização do trabalho ocorreu em duas etapas. Inicialmente foi realizada a coleta, MIV e vitrificação dos oócitos eqüinos no Laboratório de Reprodução Animal – Centro de Biotecnologia/UFPEl. Seguida pela etapa de avaliação dos oócitos por microscopia confocal, a qual foi realizada no Department of Population Health & Reproduction – School of Veterinary Medicine – University of California/ EUA.

Um dos objetivos gerais deste trabalho foi iniciar uma linha de pesquisa na área de biotecnologia da reprodução na espécie eqüina. Os objetivos específicos foram centrados em: 1) Determinar o índice de maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos equinos cultivados em presença de hormônio do crescimento eqüino (eGH), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) e associação de ambos; e 2) Avaliar características estruturais de oócitos submetidos a maturação *in vitro* e posterior vitrificação.

REVISÃO DE LITERATURA

OOGÊNESE

A formação dos oócitos (oogênese) ocorre durante a vida fetal, sem ocorrer aumento do seu número após o nascimento. Os gonócitos ou células germinativas primordiais se originam do endoderma do saco vitelino primitivo, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônia e começam a multiplicar-se através de divisões mitóticas (Junqueira & Carneiro, 1995; Van Den Hurk *et al.*, 1997).

Durante o desenvolvimento fetal, a proliferação de células germinativas primordiais ocorre por mitose e meiose no córtex ovariano. A multiplicação das oogônias, por mitose, inicia no 50º dia de gestação até, aproximadamente, o 150º-160º dia. As oogônias iniciam o processo de divisão meiótica nos 75-80 dias de gestação até o 160º dia, transformando-se em oócitos primários, os quais permanecem na fase de diplóteno da prófase I, também denominada dictióteno ou vesícula germinativa (VG) da primeira prófase meiótica, até o início da puberdade (Pierson, 1993; Picton, 2001).

Os oócitos primários apresentam-se envoltos por uma estreita camada de células da granulosa de aspecto achatado, sem zona pelúcida, formando os folículos primordiais. Os folículos neste estágio não têm suprimento sanguíneo próprio e recebem nutrientes por difusão (Van Den Hurk *et al.*, 1997).

Durante a vida fetal ocorre atresia substancial de oócitos, e a maior incidência de folículos atróficos é encontrada aproximadamente no 100º dia de gestação (Pierson, 1993).

Durante o desenvolvimento folicular pré-antral (primordiais, primários e secundários), além da diferenciação nuclear, há aumento progressivo do número de organelas, formação dos grânulos corticais e desenvolvimento das junções tipo GAP entre o oócito e as células da granulosa. Nos folículos secundários, com mais de duas camadas de células da granulosa, observa-se ao redor do oócito a formação de uma estrutura homogênea, acelular e rica em glicoproteínas, denominada zona pelúcida (Van Den Hurk *et al.*, 1997).

A retomada das divisões meióticas ocorre na puberdade durante o processo ovulatório, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH), (Dekel *et al.*, 1988). A maturação nuclear do oócito evolui até o estágio de Metáfase da segunda divisão meiótica (oócito secundário) momentos antes da ovulação. Goudet *et al.* (1998) afirma que em equinos assim como em outras espécies, a segunda divisão meiótica ocorre somente na presença do Fator Promotor da Maturação (Maturation-promoting factor – MFP) e da proteína Quinase ativadora da maturação (Mitogen activated protein kinase – MAPK).

A segunda divisão meiótica se completa somente após a fertilização (zigoto), com a extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos pró-núcleos feminino e masculino (Junqueira & Carneiro, 1995).

FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é o processo pelo qual folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para ovulação. O número de folículos ovarianos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito pequeno, estima-se que aproximadamente 99% sofrem atresia (Weeb *et al.*, 1999; Johnson, 2003).

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

Os mecanismos que regulam a ativação folicular, crescimento e diferenciação de folículos pré-antrais são pouco conhecidos. Esse entendimento possibilitaria a utilização da reserva de folículos primordiais,

incrementando a eficiência reprodutiva em animais de produção, em especial ruminantes (Fortune, 1993).

O papel das gonadotrofinas no desenvolvimento de folículos antrais está estabelecido, sendo contraditória a discussão de sua importância em folículos pré-antrais e primordiais (Fortune, 1993). Edwards *et al.* (1977) encontraram alterações quantitativas quanto ao desenvolvimento de folículos pré-antrais em camundongos hipofisectomizados, evidenciando o envolvimento das gonadotrofinas nessa etapa do desenvolvimento.

Fortune (2003) dividiu os folículos bovinos nas fases iniciais de desenvolvimento em três classes, de acordo com o seu diâmetro: 30-90 μ m (folículos primordiais, primários e pré-antrais pequenos), 90-150 μ m (folículos pré-antrais médios) e 150-220 μ m (folículos pré-antrais grandes); o que simplificou o entendimento da importância das gonadotrofinas na fase de desenvolvimento inicial da foliculogênese.

Com o desenvolvimento de estudos *in vitro* foi determinado que, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o dibutilil cAMP, o qual mimetiza a ação do FSH, estimulam o crescimento folicular e a formação do antro em folículos a partir de 140 μ m em camundongos (Hartshorne *et al.*, 1994). Em suínos, o FSH estimula o crescimento de folículos pré-antrais a partir de 200 μ m, porém não promove desenvolvimento do oócito (Mao *et al.*, 2002). Na espécie bovina, o FSH também foi eficiente na estimulação de folículos pré-antrais, aumentando em 55% a probabilidade de formação de antro, em associação com fatores de crescimento (Gutierrez *et al.*, 2000). Os efeitos potenciais do LH ainda são pouco conhecidos, contudo Wu *et al.* (2000) demonstraram que o desenvolvimento de folículos pré-antrais pequenos (85-100 μ m) em camundongos, ocorreu apenas na presença de LH, FSH e soro. Na espécie eqüina a atuação específica das gonadotrofinas na fase inicial de crescimento folicular não foi descrita até o presente momento.

A relação do hormônio do crescimento (GH) é positiva no desenvolvimento de folículos pré-antrais médios. Sua ausência provoca uma grande redução no número de folículos >200 μ m de diâmetro (Bachelot *et al.*, 2002), acarretando menor número de folículos pré-ovulatórios e reduzida taxa de ovulação (Zaczek *et al.*, 2002). A deficiência em receptores para GH leva à

redução dos níveis de fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) circulante. Contudo Bachelot *et al.* (2002) demonstram que os efeitos do GH no crescimento folicular são independentes da ação do IGF-I.

Os efeitos do IGF-I em folículos pré-antrais são pouco conhecidos. Estudos em camundongos sugerem que esse não se faz necessário até o desenvolvimento de folículos antrais (Baker *et al.*, 1996). Em eqüinos, foi comprovado que a concentração de IGF-I é maior no futuro folículo dominante e a sua presença estimula a produção de estradiol. O IGF-I está envolvido no mecanismo de divergência do folículo dominante (Ginther *et al.*, 2004).

Os esteróides atuam de forma positiva no desenvolvimento folicular pré-antral, incluindo ação em folículos primários. A presença de estradiol está relacionada ao crescimento das células da granulosa em tamanho, atuando em sinergismo com o FSH, que estimula a replicação dessas células (Hulshof *et al.*, 1995). A relação dos andrógenos sempre foi considerada negativa no desenvolvimento folicular, por estimular a ocorrência de atresia. Porém Vendola *et al.* (1998) detectaram que o implante de testosterona de liberação lenta em macacos aumentou o número de folículos primários, pré-antrais e pequenos folículos antrais ovarianos, sem demonstrar influência nos folículos pré-ovulatórios. Posteriormente, Wang *et al.* (2001) comprovaram que os andrógenos em sinergismo com o FSH promovem o crescimento folicular, produção de estradiol e de inibina em folículos de camundongo. Estas constatações não foram testadas em animais de produção (Fortune, 2003).

Acumulam-se evidências de que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais requerem a expressão de vários fatores e receptores, em particular a família dos “fatores de transformação e crescimento β ” (Transforming growth factor β – TGF- β), tem-se mostrado potentes reguladores da proliferação e diferenciação celular, nas diferentes espécies. Três membros da família TGF- β : fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF- 9), “bone morphogenetic protein” 15 (BMP-15) e 6 (BMP-6) são expressos pelo ovário, e acredita-se serem mediadores do crescimento de folículos pré-antrais (Elvin *et al.*, 2000).

Em éguas, os folículos ovarianos desenvolvem um antro quando atingem 300 μ m de diâmetro, o qual é preenchido por um fluído viscoso composto por hormônios esteróides, principalmente estradiol, progesterona e inibina. O volume e a composição desse líquido modificam-se com o desenvolvimento

folicular. Junto a esse processo ocorre a formação de uma bainha de células ao redor da granulosa, denominadas células da teca, que constituem duas camadas: a teca externa, composta basicamente por tecido conjuntivo; e a teca interna, constituindo a camada vascularizada interna. Ocorre nova proliferação das células da granulosa, as quais se organizam em várias camadas ao redor do oócito formando o “*cumulus oophorus*”. Os principais produtos secretados pelas células da teca são os andrógenos esteróides, enquanto as células da granulosa produzem estrógeno e inibina. Todos esses eventos marcam a transição de folículo secundário para terciário; o que inicia novo desenvolvimento até ser eleito à ovulação (Hafez, 1995).

Os folículos pré-antrais adquirem receptores para LH nas células da teca e para FSH nas células da granulosa. Sob o estímulo do LH, as células da teca produzem andrógenos, que ultrapassam a lâmina basal até chegarem ao antro. Durante a passagem pela camada granulosa, e sob a influência de FSH, ocorre a aromatização dos andrógenos em estrógenos (Pierson, 1993).

Em espécies monovulatórias como o eqüino, usualmente, um único folículo emergirá da onda de crescimento folicular e chegará a folículo dominante (Ginther, 2000). Durante a onda de crescimento folicular, vários folículos emergem e começam a crescer a uma taxa similar.

Uma elevação dos níveis de FSH plasmático promove o recrutamento, ou seja, a continuidade do crescimento folicular. O maior folículo emerge em média um dia antes do segundo maior folículo. Em éguas, as concentrações de FSH iniciam seu declínio quando os folículos adquirem o diâmetro de 13 mm. Neste momento, os dois folículos maiores crescem paralelamente (fase paralela). Ambos os folículos secretam inibina causando progressivo declínio da concentração de FSH, necessário para os seus próprios crescimentos. Quando o maior folículo atinge diâmetro de 22,5 mm a fase paralela finaliza-se e inicia-se a fase de divergência folicular. A divergência caracteriza-se pela contínua taxa de crescimento do maior folículo, ou seja, folículo dominante (Ginther, 2000).

O futuro folículo dominante é apto a utilizar baixas concentrações de FSH para seu crescimento e desenvolvimento, devido a um aumento na expressão de receptores para FSH (Weeb *et al.*, 1999). Em bovinos e aparentemente em eqüinos, a expressão de receptores para LH é maior no “futuro” folículo

dominante do que nos outros folículos antes da fase de divergência (Ginther *et al.*, 2003). Bodensteiner *et al.* (1996) também descreveram que a alteração na dependência gonadotrófica do folículo dominante é um dos fatores fundamentais para a seleção folicular. Além disso, existe a participação decisiva de fatores de crescimento produzidos localmente, no processo de seleção do folículo dominante (Monniaux *et al.*, 1997). Os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), IGFs e suas proteínas ligantes (IGFBPs) são considerados os fatores mais importantes nessa fase.

Em éguas, antes da fase de divergência ocorre aumento de IGF-I. O estradiol, a inibina e a activina aumentam apenas após a divergência ter iniciado, o que sugere que o fator intra-ovariano mais importante durante essa fase é o IGF-I (Ginther *et al.*, 2003).

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

MATURAÇÃO *in vivo*

A transição do oócito em estágio de vesícula germinal (VG) até metáfase II (MII), imediatamente antes à ovulação é referida como maturação oocitária. Este processo consiste em uma complexa seqüência de eventos nucleares e citoplasmáticos, que preparam o oócito para a fertilização e desenvolvimento

embrionário inicial (Fissore *et al.*, 2002). A maturação nuclear pode ser facilmente identificada pela distribuição e configuração cromossômica; a maturação citoplasmática, necessária no desenvolvimento pós-fertilização, é pouco estudada (Hinrichs *et al.*, 1995).

Durante os sucessivos ciclos estrais, ocorre estímulo para o reinício da meiose dos oócitos ovarianos, devido à presença do pico de LH ovulatório nos mamíferos. Na espécie eqüina, as condições para a maturação do oócito *in vivo* diferem das outras espécies domésticas; não há pico de liberação de LH ovulatório e sim um aumento progressivo desse durante os dias de estro. A concentração máxima ocorre 1 dia após a ovulação (Irvine & Alexander, 1994). O fator que desencadeia a retomada da maturação oocitária, em eqüinos, ainda não foi esclarecido (Hinrichs *et al.*, 1993a; Goudet *et al.*, 1998, Dell'aquila *et al.*, 2004). Tampouco é conhecido o tempo de duração do processo de maturação *in vivo* (Hinrichs *et al.*, 1993a). Entretanto, oócitos coletados de folículos pré-ovulatórios, 36 h após a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG), estão maduros (MII) (King *et al.*, 1987). Especula-se que o tempo para maturação *in vivo* é próximo de 36 h, e que ocorra sob a ação de gonadotrofinas, sendo considerado, com exceção dos suínos, um período longo de maturação em relação às demais espécies de mamíferos, nas quais varia entre 12-24 h, de acordo com Fissore *et al.* (2002).

A ocorrência de maturação meiótica é provavelmente mediada por mudanças nos padrões de fosforilação de várias proteínas celulares (Deckel, 1996). Um componente importante é o Fator Promotor da Maturação (MPF) (Goudet *et al.*, 1998), o qual é descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (Nurse, 1990). O MPF é uma proteína heterodimérica formada por uma subunidade catalítica, a proteína serina-treonina kinase p34cdc2 (Dunphy *et al.*, 1988) e uma subunidade reguladora, a ciclina B (Draetta *et al.*, 1989). A ativação de MPF depende da associação das duas subunidades (p34cdc2 e ciclina B), e da subsequente alteração do estado de tri-fosforilação da subunidade p34cdc2 (Nurse, 1990). Essa ativação induz a quebra da vesícula germinativa (QVG) e promove a progressão da meiose até MII (Deckel, 1996).

Outras quinases também estão envolvidas na regulação dos eventos da meiose, como a Proteína Quinase Ativadora da Maturação (MAPK).

A MAPK é uma serina-treonina quinase, ativada através de sua fosforilação, muito importante na regulação da transição de meiose I para meiose II e, principalmente, na manutenção do estágio de MII (Sobajima *et al.*, 1993; Fissore *et al.*, 2002). Em mamíferos, a ativação da MAPK nas células do *cumulus* é necessária para ocorrer à indução da retomada da meiose por ação de gonadotrofinas, porém a ativação da MAPK não é necessária nos casos de retomada espontânea da meiose. Após a QVG, a MAPK está envolvida na regulação da organização dos microtúbulos e na construção do fuso mitótico. A MAPK interage com outras proteínas quinases como MFP, proteína quinase A, proteína quinase C, proteínas quinase II dependentes de calmodulina e proteínas fosfatases para a regulação do ciclo celular meiótico do oócito (Fan & Sun, 2004). Goudet *et al.* (1998) demonstraram a presença de MAPK e das duas subunidades de MPF em oócitos eqüinos.

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

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

A maturação citoplasmática é caracterizada por mudanças no formato e distribuição das organelas celulares. Ocorrem alterações qualitativas na síntese protéica do oócito, que além de auxiliarem no processo de retomada da meiose previnem a polispermia durante a fertilização (Fissore *et al.*, 2002). Essas mudanças estão intimamente relacionadas com a aquisição da competência meiótica e a capacidade do oócito ser fecundado e sofrer desenvolvimento embrionário (Hyttel *et al.*, 1989).

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

MATURAÇÃO *in vitro*

O processo de maturação *in vitro* em eqüinos (MIV) tem sido motivo de estudo por diversos grupos de pesquisa: Fulka & Okolski (1981), Desjardins *et al.* (1985), Del Campo *et al.* (1990), Zhang *et al.* (1990), Willis *et al.* (1991), Choi *et al.* (1993), Hirinchs *et al.* (1993a) e Carneiro *et al.* (2001). No Brasil, até o presente momento, o grupo de Landin-Alvarenga *et al.* (2002) vêm desenvolvendo pesquisas específicas com MIV em eqüinos. Os protocolos mais utilizados são baseados na produção *in vitro* de embriões bovinos. As taxas de MIV em eqüinos são baixas, quando comparadas com outras espécies, geralmente obtêm-se entre 35 e 60% de oócitos em MII (Dell'aquila *et al.*, 1997; Hinrichs & Williams, 1997), enquanto em bovinos esses índices chegam a 97% (Shioka *et al.*, 1988).

Os fatores que podem estar envolvidos com esses baixos índices na espécie eqüina, vão desde a dificuldade na coleta dos oócitos, tempo de incubação, meio de cultivo utilizado, co-cultivo de células somáticas, adição de hormônios e fatores de crescimento; e principalmente o pouco conhecimento sobre os fatores que desencadeiam a meiose *in vivo* na espécie.

O índice de recuperação de oócitos na espécie eqüina é inferior do que em outras espécies de produção (Shabpared *et al.*, 1993). A presença do *cumulus oophorus* mais aderido à parede do folículo do que em outras espécies e a localização dos mesmos, são fatores diretamente relacionados a esses índices (Brück *et al.*, 1999; Hawley *et al.*, 1995).

Os métodos de coleta utilizados para obtenção de oócitos eqüinos são: aspiração folicular, “fatiamiento” do ovário (*slicing*) (Choi *et al.*, 1993) e a curetagem da parede folicular (*scraping*) (Hinrichs *et al.*, 1993a).

A média de recuperação de oócitos por aspiração do fluído folicular é de 0,8 a 1,75 oócitos/ovário (Choi *et al.*, 1993, Pereira, 1997). A associação do *slicing*, pós aspiração dos folículos presentes na superfície do ovário, aumenta a taxa de recuperação para 5,98 oócitos/ovário (Choi *et al.*, 1993). Alguns autores propuseram a lavagem do folículo com fluxo contínuo de Solução salina fosfatada tamponada (PBS) acrescida de diferentes concentrações de hialuronidase. Não houve incremento no índice de oócitos recuperados em relação à aspiração do fluído folicular (6,0 vs 7,4 oócitos/égua), além dos oócitos demonstrarem menores índices de maturação quando coletados em presença da hialuronidase (Shabpared *et al.*, 1993). Utilizando *scraping* da parede dos folículos, os índices de recuperação estão entre 2,15 e 4,1 oócitos/ovário (Hinrichs *et al.*, 1993a, Hinrichs & Williams, 1997, Dell’aquila *et al.*, 2001, Choi *et al.*, 2002a).

Devido à baixa recuperação e a grande ocorrência de *cumulus oophorus* (CCO) incompletos, a aspiração folicular tem sido pouco utilizada (Hinrichs, 1991). O *slicing* demonstra ser uma técnica prática e rápida, entretanto, não se pode determinar o tamanho dos folículos utilizados, além da maior chance de contaminação dos oócitos. O *scraping* da parede folicular é uma técnica que permite ótimos índices de recuperação, com raras ocorrências de lesões nos CCO (Choi *et al.*, 1993); possui a desvantagem de ser laboriosa e consumir grandes períodos de tempo para a sua realização em relação ao *slicing* (Shabpared *et al.*, 1993).

O tempo decorrido desde a coleta dos ovários até o cultivo *in vitro* dos oócito é amplamente discutido. Oócitos provenientes de ovários coletados entre 5 a 6 h, 6 a 7 h e 7 a 8 h, após a morte do animal, não demonstraram

diferença nas características de expansão do *cumulus* e nos índices de maturação (Shabpareh *et al.*, 1993). Também não foi identificada diferença nos índices de maturação quando esse tempo foi de 3 a 9 h e de 10 a 15 h após o abate (Del Campo *et al.*, 1995). O armazenamento dos ovários *overnight* (15-18 horas) à temperatura ambiente (25-31°C) ou resfriado a 4°C, reduziu as taxas de maturação em relação ao controle (Love *et al.*, 2003). Na maioria dos trabalhos, o tempo desde a coleta dos ovários até o cultivo *in vitro* é entre 3 e 5 h. Segundo Del Campo *et al.* (1995), o pré-cultivo dos oócitos na temperatura de 30°C, desde a recuperação até o cultivo, não altera as características do *cumulus*, capacidade de retomada da meiose e maturação nuclear.

A coleta dos oócitos de ovários provenientes de abatedouro possui o inconveniente de não fornecer informações sobre a procedência, idade e fase do ciclo estral das éguas. Isso pode transparecer a idéia de inconsistência dos resultados obtidos desses materiais. Devido a essas preocupações, Brinsko *et al.* (1995) dividiram as éguas abatidas em três grupos de acordo com a idade. Não foram encontradas diferenças entre o número de oócitos recuperados por ovário. Observaram ainda que oócitos provenientes de éguas com idade ≥ 15 anos possuem capacidade de retomar a meiose, porém com menores índices de maturação (MII) em 24 h.

Utilizando ovários de matadouro, Brück *et al.* (1996) não constataram diferença no índice de maturação em relação à estação reprodutiva e a fase do ciclo estral das éguas. Identificaram que oócitos proveniente de folículos ≤ 10 mm de diâmetro possuem menor capacidade para atingir a maturação nuclear do que os provenientes de folículos maiores, confirmando a constatação de Del Campo *et al.* (1995), que encontraram 44% de oócitos degenerados em folículos entre 5-10 mm de diâmetro. Goudet *et al.* (1997) demonstrou não haver diferença no índice de maturação de oócitos eqüinos coletados *in vivo* durante a fase folicular ou luteínica do ciclo estral.

No momento da coleta, o estágio de maturação dos oócitos provenientes de folículos com diâmetro entre 10 mm e 30 mm é basicamente VG (60%) e QVG (36%) (Del Campo *et al.*, 1995), sendo que o índice de MII é baixo, não atingindo 5% (Brück *et al.*, 1996). Oócitos no estágio de VG, especialmente

com cromatina condensada, e QVG são considerados ideais para os estudos de MIV, por estarem aptos à retomada da meiose.

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

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

O processo de expansão do *cumulus* é acompanhado de modificações nas junções GAP, essas junções são canais que fazem a ligação do *cumulus* ao oócito, são formadas por hexâmeros de proteínas provenientes da família das conexinas. Células do *cumulus* de eqüinos e suínos expressam a proteína conexina 43. A retomada da meiose nessas espécies está relacionada à redução do nível dessa proteína no *cumulus* (Grazul-Bilska *et al.*, 1997; Marchal *et al.*, 2003).

A expansão total das células do *cumulus* está diretamente relacionada à maturação citoplasmática em humanos e camundongos (Testar *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1993). Em bovinos, a expansão do *cumulus* no momento da recuperação do oócito, está associada à atresia folicular, sendo um critério de exclusão na seleção de CCO que serão submetidos à MIV (Blondin & Sirard, 1995).

Quando se avalia atresia folicular, o complexo *cumulus oophorus* é a última porção do folículo a ser afetada e mesmo em estádios avançados

apenas 25% dos CCO's apresentam sinais de degeneração. Folículos com mais de 73% das células apoptóticas ainda podem oferecer oócitos competentes (Hawley *et al.*, 1995). Estádios iniciais de atresia parecem estimular a competência do oócito ao desenvolvimento *in vitro* em bovinos (Blondin & Sirard, 1995) e eqüinos (Hinrichs & Williams, 1997). A expansão do *cumulus* de oócitos eqüinos também está relacionada a apoptose das células da granulosa e não possui relação com o tamanho dos folículos. Oócitos expandidos (EX) de folículos atrésicos, possuem cromatina compacta e demonstram maior competência meiótica em relação à oócitos com *cumulus* compacto (COC) (Hinrichs & Williams, 1997), porém, não possuem melhores índices de ativação após injeção intra-citoplasmática de espermatozóide (ICSI) do que COC (Dell'aquila *et al.*, 2003).

Muitas dúvidas e discussões permanecem sobre a seleção e viabilidade dos CCO. Sendo necessária à padronização de sistemas de cultivo específicos para cada tipo de oócito coletado, para dessa forma incrementar de forma eficiente a produção de embriões *in vitro* na espécie eqüina.

A determinação da maturação oocitária em eqüinos, assim como em outras espécies, é realizada geralmente por colorações específicas que identificam apenas a conclusão da maturação nuclear. O insucesso na realização de FIV na espécie eqüina pode estar relacionado a uma MIV inadequada, especificamente com relação à maturação citoplasmática (Carneiro, 2002).

Avaliando-se a maturação nuclear por microscopia óptica ou de fluorescência, os oócitos podem ser classificados em: VG (apresenta núcleo esférico localizado central ou periféricamente no ooplasma), QVG (núcleo com carioteca irregular ao redor da cromatina condensada ou dispersa), MI (cromossomos arranjados na placa metafisária, localizada na periferia do ooplasma), MII (cromossomos metafisários na periferia do ooplasma e corpúsculo polar no espaço perivitelínico) (Hinrichs *et al.*, 1993b; Grondahl *et al.*, 1995). Hinrichs *et al.* (1993b) caracterizaram as fases de evolução da meiose por microscopia de fluorescência. Demonstraram características especiais na conformação da cromatina na fase de VG, classificando-a em: dispersa, condensada e pouco condensada. Oócitos em fase de VG com cromatina difusa (núcleo fluorescente) demonstram menor capacidade de

maturação em sistemas de cultivo *in vitro* (Alm & Hinrichs, 1996). A utilização de fluorescência permite uma visualização mais clara da configuração da cromatina; por utilizar corantes específicos para DNA, impedindo a interferência dos lipídeos intracelulares (Hinrichs *et al.*, 1993a).

Os oócitos, quando retirados dos folículos, sofrem maturação nuclear espontaneamente. Portanto, a principal estratégia dos sistemas de cultivo têm sido prover condições que suportem e otimizem a maturação nuclear espontânea. No entanto, as condições de cultivo atuais, suportam a maturação nuclear espontânea, mas não promovem a maturação citoplasmática do gameta (Aguilar *et al.*, 2001).

A maturação citoplasmática pode ser considerada um processo que promove modificações no gameta feminino, tornando-o competente para os eventos de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. Durante esse processo, os oócitos sofrem alterações bioquímicas e estruturais. Observa-se a redistribuição de organelas, como os grânulos corticais (GC), mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, que auxiliam a ocorrência da exocitose dos GC desencadeada pela fertilização (Dulcibella *et al.*, 1993).

A avaliação do acesso à maturação citoplasmática em eqüinos pode ser realizada avaliando-se: a distribuição das organelas por microscopia eletrônica (Hytel *et al.*, 1997; Pereira, 1997; Landim-Alvarenga *et al.*, 2002; Fernandes, 2004), a migração dos grânulos corticais (Cran, 1989; Neuman *et al.*, 1995; Goudet *et al.*, 1997; Carneiro *et al.*, 2002a), por clivagem partenogenética (Carneiro *et al.*, 2001) ou técnicas de fertilização (Carnevale, 1996).

O primeiro grupo que avaliou maturação citoplasmática em eqüinos foi Neuman *et al.* (1995), através de microscopia eletrônica, porém utilizando um pequeno número de oócitos (n=14). Em 1997, Goudet *et al.* constataram a localização periférica dos GC em oócitos maduros (Telófase I e MII), colhidos de folículos pré-ovulatórios, concordando com o que já havia sido descrito em outras espécies (Cran, 1989).

Na avaliação por microscopia confocal de oócitos eqüinos foi definido que os GC estão distribuídos de forma aleatória no citoplasma dos oócitos imaturos em estágio de VG. Durante a maturação, os GC migram de forma progressiva do centro para a periferia do ooplasma, organizando-se na forma de

monocamada próxima à membrana do oócito. Essa migração ocorre em torno de 30 horas de maturação (Carneiro *et al.*, 2002a).

A microscopia confocal utiliza uma fonte de luz laser para promover a excitação de fluoróforos. Permite a obtenção de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma célula, construindo imagens bidimensionais e tridimensionais. Esse seccionamento óptico do material e a visualização tridimensional são as maiores vantagens dessa técnica em relação à microscopia de fluorescência convencional (Smaili, 2001).

A utilização de microscopia confocal permite avaliar a maturação nuclear e citoplasmática do oócito. É possível identificar a emissão de luz de mais de um fluoróforo, tanto da fluoresceína nos GC (coloração verde) como do iodeto de propídeo que possui afinidade pelo DNA (coloração vermelha) (Carneiro *et al.*, 2002a).

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

Shabpareh *et al.* (1993), comparam a utilização de TCM e Ham F10 na maturação de oócitos eqüinos, e obtiveram maior índice de maturação com TCM em 36 horas de cultivo, porém não encontraram diferença entre ambos após 48 horas de cultivo.

Willis *et al.* (1991) compararam a utilização de meio de cultivo de tecidos (tissue culture media –TCM) e Menezo B2, com suplementação de diferentes fontes protéicas: albumina sérica bovina (BSA), soro fetal bovino (SFB), soro de éguas em estro e soro de éguas no dia da ovulação. E observaram uma redução significativa na maturação nuclear dos oócitos em meio suplementado com BSA, quando comparado à utilização de outras fontes protéicas. A utilização da fração V de BSA não altera a maturação de oócitos bovinos, porém está relacionada com diminuição do desenvolvimento de embriões após FIV (Ali & Sirard, 2002). Esses mesmos autores não conseguiram estabelecer qualquer “toxicidade” relacionada à BSA-V, obtendo índices de desenvolvimento embrionário satisfatório quando essa foi associada com BSA purificado, BSA-FAF ou albumina proveniente de ovos de frangos.

A utilização de BSA como suplemento protéico é amplamente difundido na MIV de oócitos eqüinos, sendo descrita por Dell'aquilla *et al.* (2004) e Fernandes (2004).

A importância das células somáticas durante o processo de maturação *in vivo* é clara, e tem sido positiva nos sistemas de cultivo para MIV em bovinos (Squires, 1996). Alm & Torner (1994) afirmam ser positivo o co-cultivo de oócitos eqüinos com células da granulosa na maturação nuclear. No entanto, estudos utilizando células da teca em co-cultivo com COC eqüinos, não encontraram diferença na maturação nuclear ou citoplasmática desses (Choi *et al.*, 2002b).

Hinrichs *et al.* (1993a) indicaram que o tempo de permanência do oócito eqüino em cultivo deve ser maior que das outras espécies. O tempo médio necessário para a maioria dos oócitos encontrar-se nuclearmente maturo oscila entre 28-36 horas (Carneiro, 2002). Foi comprovado que a adição de IGF-I ao meio de cultivo diminui o tempo de progressão meiótica de oócitos eqüinos, sugerindo que o tempo necessário de maturação na espécie eqüina está intimamente relacionado ao sistema de maturação utilizado (Carneiro *et al.*, 2001; Carneiro, 2002).

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

A maioria dos protocolos para MIV em eqüinos utiliza a adição de hormônios gonadotróficos – LH e FSH, e estradiol. Existem evidências de que o LH altera a distribuição citoplasmática de cálcio, promove aumento da glicólise e aumente o metabolismo da glutamina (Zuelke & Brackett, 1993). A presença de FSH não influenciou de forma significativa a expansão das células do *cumulus*, como citado em outras espécies; porém concordou com a afirmação de que sua presença não acarreta efeito na proporção de oócitos que atingem MII (Dell'aquilla *et al.*, 2004), já reportada em suínos (Singh *et al.*, 1993). Segundo Willis *et al.* (1991) a adição de LH (bovino ou eqüino), independente da presença de FSH, não promoveu diferença no índice de

maturação de oócitos eqüinos, porém a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) aumentou o índice de MII, após 32 horas de cultivo. Alguns pesquisadores afirmam que a presença de LH bovino pode inibir a maturação oocitária de eqüinos, enquanto o de origem eqüina não provocaria essa inibição (Zhang *et al.*, 1989).

O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) é um peptídeo que atua estimulando a proliferação de células epiteliais. Atua também regulando a maturação oocitária, estimula a QVG e induz a expansão das células do *cumulus oophorus* (Buccione *et al.*, 1990). A presença do EGF demonstrou ser um estímulo positivo na maturação de oócitos eqüinos, porém ineficaz em oócitos desnudos (Lorenzo *et al.*, 2001).

FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA -I (IGF-I)

As IGFs, IGF-I e IGF-II, são moléculas de baixo peso molecular, denominadas peptídeos mitogênicos, estruturalmente relacionados a pró-insulina (Giudice, 1992).

A ação biológica dos IGFs é mediada, nas células alvo, por receptores específicos de membrana. O estímulo desses receptores induz efeitos de crescimento mitogênico e de citodiferenciação (Adashi *et al.*, 1986). O peptídeo IGF-I exerce atividade estimulante sobre a proliferação das células do *cumulus*, a esteroidogênese, a foliculogênese, a ovulação, a fertilização, implantação e subsequente desenvolvimento embrionário (Lackey *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* têm demonstrado que as células da granulosa seriam o sítio de ação e secreção de IGF-I (Adashi *et al.*, 1986).

As IGFs são encontradas nos fluídos corporais em associação com proteínas específicas de ligação de IGF (IGFBPs). As IGFBPs regulam a ação fisiológica dos IGFs. Podem agir como carreadores passivos, prolongando a meia-vida dos IGFs, e na maioria das situações, bloqueiam suas ações por inibirem a interação com os receptores específicos na superfície das células alvo (Giudice, 1992).

Em mamíferos domésticos, o crescimento folicular e atresia estão associados a mudanças nos níveis de IGF-I e IGFBPs no fluído folicular (Spicer

& Echternkamp, 1995; Monget *et al.*, 2002). Existem pelo menos seis diferentes IGFBPs, que possuem alta afinidade pelos IGFs (Spicer & Echternkamp, 1995). Em culturas de células da teca e granulosa, IGFBPs possuem a habilidade de inibir os efeitos sinérgicos do IGF-I e gonadotrofinas sobre a esteroidogênese.

Em bovinos, foi comprovado que em folículos pré-ovulatórios ocorre redução das IGFBPs 2, 4 e 5, por ação de proteases e redução da síntese dessas proteínas, associada a um aumento da IGF-I livre (Spicer, 2004).

Bridges *et al.*, 2002 não encontraram a presença de IGFBPs 2 no fluido folicular de éguas. Carneiro *et al.*, 2002b determinou que em eqüinos o crescimento folicular está associado com decréscimo de IGFBP-3 e aumento de IGF-I livre, sugerindo que esse possui importante envolvimento no sistema de maturação de oócitos *in vivo*.

Com a hipótese de que a adição de IGF-I aumentaria os índices de maturação de oócitos eqüinos em sistemas *in vitro*, Carneiro *et al.* (2001) determinaram que o IGF-I no meio de cultivo incrementou os índices de maturação nuclear em eqüinos, de forma dose dependente, sendo a concentração indicada de 200ng/ml de IGF-I. A adição de IGF-I em meio contendo gonadotrofinas, estradiol e SFB não influenciou o índice de maturação nuclear, porém exerceu efeito positivo na maturação citoplasmática, avaliada por partenogênese.

Posteriormente, foi determinado que a adição de IGF-I no meio induz a um maior acúmulo de MAPK no citoplasma, o que por sua vez, se refletiu em maior índice de formação de embriões após partenogênese de oócitos eqüinos (Li *et al.*, 2004).

HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)

O GH é secretado pelo lobo anterior da hipófise na circulação, liga-se a receptores nos tecidos alvo com o objetivo de estimular o crescimento (Herrington & Carter-Su, 2001).

Muitas ações do GH são mediadas por IGF-I, o qual é secretado nos tecidos em resposta ao GH (Herrler *et al.*, 1992). Em ratos a ação do GH na MIV é mediada por IGF-I, provavelmente produzido pelas células do cumulus

(Apa *et al.*, 1994). Em bovinos, já existe a comprovação de que a ação do GH na maturação de oócitos bovinos é por ação direta nos receptores para GH (GHR), não ocorrendo interferência do IGF-I (Izadyar *et al.*, 1997).

Em bovinos foi identificada a presença de GH e GHR no oócito e células *cumulus*. Também identificaram a presença mRNA para GH no oócito e células da granulosa, indicando a capacidade de síntese do hormônio. Isso sugere a participação do GH na regulação parácrina e/ou autócrina do crescimento folicular e maturação em bovinos (Izadyar *et al.*, 1997).

Em eqüinos foi identificada a presença de GHR e mRNA para GHR em oócitos desnudos e células do *cumulus*, sugerindo a possibilidade de ação direta do hormônio no oócito. Em ratos e bovinos tal hipótese já foi testada, não desenvolvendo o resultado esperado, o que indica que a ação do GH é mediada pelas células do *cumulus* (Marchal *et al.*, 2003).

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos em presença de GH (100ng/ml) acelera o processo de QVG, entretanto, não altera o índice de oócitos que chegam a MII após 24h de cultivo (Izadyar *et al.*, 1996). Mesmo não melhorando os índices de maturação nuclear, Izadyar *et al.* (1998) demonstraram um aumento significativo no índice de maturação citoplasmática – migração de grânulos corticais – de oócitos bovinos em presença de GH em relação ao controle (35 vs 17%).

A presença do GH induz a expansão do *cumulus* e melhora os índices de FIV e desenvolvimento até o estágio de blastocisto, em bovinos (Izadyar *et al.*, 1996).

Marchal *et al.* (2003), utilizou a adição de 500ng/ml de hormônio do crescimento eqüino (eGH) no cultivo de oócitos eqüinos coletados por aspiração *in vivo* e coletados de ovários de abatedouro. Em ambos os grupos de oócitos, não foram encontradas diferenças nos índices de MII em relação ao controle. Quando a totalidade dos oócitos foi avaliada, independente do método de coleta utilizado, foi encontrado aumento no índice de maturação nuclear no grupo com adição de eGH.

Fernandes (2004) não obteve incremento nos índices de maturação nuclear e citoplasmática com a utilização de 100ng/ml de eGH e 5µg/ml de FSH eqüino (eFSH) em meio básico de Eagle (BME) com adição de fluído

tubárico humano (HTF). Observou uma tendência a menor número de oócitos degenerados.

VITRIFICAÇÃO

A vitrificação é uma técnica que possibilita a criopreservação de oócitos e embriões sob condições diferenciadas. Baseada no resfriamento de células em velocidades ultra-rápidas, promove a solidificação das soluções, não por cristalização, mas sim por um drástico aumento da viscosidade (Fahy *et al.*, 1984). É uma técnica de criopreservação simples, onde a taxa de resfriamento da água pura é calculada em $-107^{\circ}\text{C}/\text{seg}$. Consiste na imersão direta da solução de vitrificação, a qual possui altas concentrações de crioprotetores, no nitrogênio líquido (Rall, 1987). A vitrificação é o método de crioproteção utilizado naturalmente por algumas plantas do ártico (Hirsh *et al.*, 1987).

Os dois parâmetros mais importantes que devem ser levados em consideração para o sucesso da vitrificação são: a velocidade de resfriamento (taxa de resfriamento) e a concentração do crioprotetor, uma vez que existe um limite tolerável. Portanto, a utilização da máxima taxa de resfriamento associada à mínima concentração aceitável de crioprotetores é o ideal (Liebermann *et al.*, 2002). A taxa ideal de resfriamento será aquela que permitir a saída da maior quantidade de água da célula, para que essa sofra a vitrificação no meio extracelular. O momento crítico do processo é a passagem pela zona de resfriamento de $+15$ a -5°C . A passagem rápida por essa fase diminui as lesões provocadas pelo resfriamento, isto é, alterações nas gotas lipídicas, nos lipídeos constituintes de membranas e lesões no citoesqueleto (Dobrinsky, 1996; Martino *et al.*, 1996; Isachenko *et al.*, 1998). O tempo de equilíbrio na solução, antes do resfriamento, deve ser longo o suficiente para permitir a desidratação celular, sem acarretar danos à célula.

O processo de criopreservação de oócitos maduros e imaturos possui vários limitantes, como o grande volume em relação à área de superfície (Vatja, 2000), a sensibilidade dos oócitos a baixas temperaturas (Aman & Parker, 1994; Martino, *et al.*, 1996), alterações que promovem o endurecimento na

zona pelúcida (Carrol *et al.*, 1990; Asada *et al.*, 2002) e a necessidade de remoção das células do *cumulus* (Le Gal & Massip, 1999; Vatja, 2000).

Devido a limitantes no processo de MIV de oócitos eqüinos, a criopreservação tem focado a utilização de oócitos maduros, em MII (Isachenko *et al.*, 1998; Dinnyes *et al.*, 2000). A fase de maturação tem sido relacionada com a capacidade do oócito em resistir a criopreservação. Oócitos em MII demonstram maior flexibilidade do citoesqueleto do que na fase de MI, além de serem mais resistentes a criopreservação (Isachenko *et al.*, 1998).

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: os permeáveis a membrana ou internos (glicerol, propanediol, acetamidas, etilenoglicol e dimetildulfoxido- DMSO) e não permeáveis à membrana ou externos (sacarose, trealose, glicose, amido, ficoll, proteínas e lipoproteínas) (Karow, 1991).

Os crioprotetores internos possuem baixo peso molecular e alta solubilidade na água, o seu mecanismo de ação é atribuído às propriedades coligativas com moléculas de água. Suas principais ações são: a diminuição do ponto de congelamento das soluções, por interações com eletrólitos e a estabilização da membrana plasmática, devido a interações com proteínas (Rall *et al.*, 1984).

Os crioprotetores não permeáveis são representados por moléculas de grande dimensão que não conseguem penetrar na membrana plasmática. Eles aumentam a concentração de solutos extracelulares, gerando um gradiente osmótico através da membrana da célula; o que carrega água para o exterior, causando uma desidratação celular antes do processo de congelamento (Karow, 1991).

Macromoléculas, como os açúcares e SFB, reduzem a toxicidade das soluções crioprotetoras (Karow, 1991). Polímeros sintéticos podem ser utilizados como substituto do SFB na criopreservação (Carrol *et al.*, 1993; Naitana *et al.*, 1997; Sommerfeld & Niemann, 1999). O copolímero PVA (vinil acetato + vinil álcool) em baixas concentrações inibe a formação de gelo em soluções de congelamento, é também denominado bloqueador sintético da formação de gelo (*ice blocker*) (Wowk *et al.*, 2000). Tem sido utilizado em soluções de vitrificação de células bacterianas (Wowk *et al.*, 2002), oócitos suínos (Macedo, 2002) e oócitos de camundongos (Fahy *et al.*, 2004). Em experimentos *in vitro* utilizando copolímero PVA, na concentração $1:10^6$, foi

possível a visualização de soluções aquosas em estado sólido sem a formação de cristais de gelo (Wowk *et al.*, 2000).

O uso de copolímero PVA possui a vantagem de excluir a utilização de substâncias de origem animal nas soluções de vitrificação, além da grande capacidade de inibir a formação de cristais de gelo (Wowk *et al.*, 2002).

Não foram encontrados trabalhos, até o presente momento, que avaliem a adição de copolímero PVA nas soluções de vitrificação de oócitos eqüinos.

Em bovinos e camundongos o processo de vitrificação tem sido realizado com uma gama variada de crioprotetores, que inclui Dimetilsulfóxido (DMSO), acetamida, propilenoglicol (Otoi *et al.*, 1995); etilenoglicol e DMSO (Schellander *et al.*, 1994) e Glicerol, 1,2-propanediol e DMSO (Vatja *et al.*, 1998), variando-se a concentração e os tempos de permanência nas soluções. Protocolos de vitrificação rápidos e ultra-rápidos, aplicados em oócitos bovinos, obtiveram formação de blastocistos similares aos provenientes de oócitos não criopreservados submetidos à FIV (Martino *et al.*, 1996; Papis *et al.*, 1999; Vatja *et al.*, 1998). Em eqüinos os trabalhos são reduzidos e limitados à utilização de etilenoglicol, ficoll, sacarose (Hochi *et al.*, 1995; Hochi *et al.*, 1996; Hurtt *et al.*, 2000), com adição de trealose (Maclellan *et al.*, 2001) e dimetilsulfóxido (Maclellan *et al.*, 2001; Maclellan *et al.*, 2002). O congelamento de oócitos eqüinos imaturos, com a utilização de etilenoglicol, resultou em 16% de oócitos maduros por MIV (Hochi *et al.*, 1994). Sendo que a utilização de glicerol como crioprotetor foi desaconselhada pelo mesmo autor.

Na avaliação da capacidade de fertilização de oócitos eqüinos vitrificados-descongelados, foram descritos de 41 a 50% de formação de dois pro-núcleos após ICSI (Maclellan *et al.*, 2001). Existe apenas uma descrição, até o presente momento, de obtenção de prenhez e nascimento de potro a termo proveniente da fertilização de oócito eqüino vitrificado, sendo o mesmo maturado *in vivo* e fertilizado por GIFT (Maclellan *et al.*, 2002).

Os protocolos de vitrificação de oócitos eqüinos também sofreram modificações e a porcentagem de oócitos que completaram a meiose após vitrificação evoluiu de 17% (Hochi *et al.*, 1995) para 70% (Maclellan *et al.*, 2001) e 81% (Hurtt *et al.*, 2000). A principal mudança ocorreu nos tempos de exposição dos oócitos às soluções de vitrificação.

Outro fator importante, na evolução do processo, foi à mudança na utilização de palheta de 0,25 e 0,50 ml para a extendida (open-pulled straws – OPS) (Hurtt *et al.*, 2000). A utilização de micropipetas de vidro foi testada com sucesso em oócitos bovinos (Mezzalana *et al.*, 1999). O método de congelamento em OPS oferece muitas vantagens sobre as outras técnicas de criopreservação (Bertholot *et al.*, 2000). O reduzido volume de solução de vitrificação e a menor espessura da parede da OPS possibilitam aumento na velocidade de congelamento e descongelamento (Hurtt *et al.*, 2000; López-Béjar & López-Gatius, 2002). O método de OPS também vem sendo utilizado em oócitos bovinos (Santos, 2005) e na vitrificação de células tronco embrionárias, em humanos (Reubinoff *et al.*, 2001),

**MATURAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQÜINOS INCUBADOS EM
MEIO CONTENDO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I**

(Artigo nas normas da revista Theriogenology)

**MATURAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQÜINOS INCUBADOS EM
MEIO CONTENDO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-I ¹**

B.R. Curcio*²; J.C. Deschamps²; C.E.W. Nogueira³; G.R. Pereira⁴; M.C.
Macedo Jr²; T. Lucia Jr²; A.L.N Boff³; P.M. De Leon³; G. Rambo²

Centro de Biotecnologia², Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de
Pelotas-96010-900 - Pelotas-RS, Brasil

Departamento de Clínicas Veterinárias³, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas-96010-900 - Pelotas-RS, Brasil

Department of Population Health & Reproduction⁴, School of Veterinary
Medicine, University of California, Davis, California 95616.

* Corresponding author. Tel.: +55-53-275-7388; fax: +55-53-275-7551
E-mail address: curciobr@tutopia.com.br

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Veterinária, área de Reprodução Animal, Universidade Federal de Pelotas (UFPel) como uma das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da adição de hormônio do crescimento eqüino (eGH), fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I) e associação de ambos na maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. Também foi avaliada a integridade estrutural de oócitos maturados e vitrificados em presença de copolímero PVA. Complexos *cumulus-oophorus* compactos foram cultivados (n=122) em TCM-199 com adição de eGH, IGF-I ou eGH + IGF-I, por 30h. Após, oócitos do grupo controle foram fixados (n=37), e o restante submetido à vitrificação (n=85). Os oócitos criopreservados foram expostos a 1,4 M dimetilsulfóxido (DMSO), 1,8 M etilenoglicol (EG) e 1% copolímero PVA por 3 min, transferidos para TCM com 2,8 M DMSO + 3,6 M EG + 0,6 M sacarose + 1% copolímero PVA por 1 min. e envasados em palhetas abertas estendidas (OPS), para vitrificação. Todos os oócitos foram avaliados morfolologicamente por microscopia confocal. Os índices de maturação oocitária foram similares ($p>0,05$) entre os tratamentos. Contudo, os resultados sugerem que a associação de eGH e IGF-I pode incrementar o índice de retomada da meiose (MI+MII=86,7%). Pode-se concluir, que não houve diferença no índice de maturação nuclear e citoplasmático com a adição de eGH, IGF-I e associação de ambos. Os oócitos eqüinos submetidos à vitrificação utilizando o copolímero PVA permaneceram com membrana plasmática íntegra, não ocorrendo vacuolização e degeneração.

Palavras-chave: hormônio do crescimento eqüino, fator de crescimento semelhante à insulina-I, vitrificação, oócitos eqüinos, MIV.

Abstract

The study investigated the effects of equine growth hormone (eGH) and its relationship with insulin-like growth factor-I (IGF-I) on the *in vitro* maturation (IVM) of equine oocytes. We also evaluated the morphological and structural integrity of IVM and cryopreserved oocytes. Compact *cumulus oophorus* complexes (n=122) were cultured in TCM-199 with eGH, IGF-I or eGH + IGF-I for 30h. After maturation, oocytes were fixed (n=37) or subjected to the vitrification protocol (n=85). Cryopreserved oocytes were exposed to 1,4 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + 1,8 M ethylene glycol (EG) + 1% PVA copolymer

for 3 min, and then transfer to 2,8 M DMSO + 3,6 M EG + 0,6 M sucrose + 1% PVA copolymer for 1 min. Next, the oocytes were loaded to the open pulled straw (OPS) for vitrification. All oocytes were observed under a confocal microscope. Maturation rates of oocytes weren't significant difference among the treatment groups ($p>0,05$). The results suggest that the eGH + IGF-1 group can develop the assessment resumption of meiosis (MI+MII=86.7%). In conclusion, the addition of eGH and/or IGF-I to our IVM protocol didn't increase rates of nuclear and cytoplasmic maturation. Oocytes subject to vitrification with copolymer PVA had an intact plasma membrane and didn't show any sign of vacuolization or degeneration.

Keys-word: equine growth hormone, insulin growth factor-I, vitrification, equine oocytes, IVM.

Introdução

As taxas de maturação *in vitro* (MIV) em eqüinos são baixas, quando comparadas com outras espécies domésticas, situando-se entre 35 e 60% de oócitos em metáfase II (MII) [1,2,3,4]. Os fatores que podem estar envolvidos com esses baixos índices na espécie eqüina, vão desde a dificuldade na coleta dos oócitos, determinação do tempo de incubação e meio de cultivo utilizado, avaliação da necessidade de co-cultivo de células somáticas, adição de hormônios e fatores de crescimento; até o pouco conhecimento sobre os fatores que desencadeiam a meiose *in vivo* na espécie [3,4].

Alguns estudos demonstraram que fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF) [5], fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) [3] e o hormônio do crescimento (GH) [6] agem em associação com as gonadotrofinas, formando o complexo sistema de fatores autócrinos e parácrinos que influenciam a maturação oocitária [7].

A adição de IGF-I em sistemas de cultivo para oócitos eqüinos foi descrita por Carneiro *et al.* [3], o qual obteve incremento na maturação nuclear e citoplasmática avaliada por partenogênese.

Os incrementos nos índices de maturação nuclear e citoplasmática na presença de IGF-I em eqüinos [3] e a capacidade do GH em acelerar a quebra da vesícula germinal (QVG) na retomada da meiose em bovinos [6], sugerem a hipótese de que a associação de IGF-I e GH no cultivo de oócitos eqüinos

possibilitaria aumento nos índices de maturação. A associação desses hormônios ainda não foi utilizada em sistemas de MIV para oócitos eqüinos.

A vitrificação é uma técnica de criopreservação, utilizada em oócitos e embriões [10,11], que minimiza as lesões provocadas pelo congelamento convencional. Consiste na redução ultra-rápida da temperatura e utilização de soluções com altas concentrações de crioprotetores, que evitam a formação de cristais de gelo intracelulares [12]. Existem poucos trabalhos sobre técnicas de vitrificação de oócitos eqüinos, sendo limitados à utilização de etilenoglicol, ficoll, sacarose [13,14,15], trealose [16] e dimetilsulfóxido [16,17].

As macromoléculas, como os açúcares e o soro fetal bovino (SFB), reduzem a toxicidade das soluções crioprotetoras [18]. Polímeros sintéticos podem ser utilizados como substituto do SFB na criopreservação [19,20,21]. O copolímero PVA (vinil acetato + vinil álcool), em baixas concentrações, inibe a formação de gelo em soluções de congelamento, sendo também denominado bloqueador sintético da formação de gelo (*ice blocker*) [22]. Tem sido utilizado em soluções de vitrificação de células bacterianas [23], oócitos suínos [24] e oócitos de camundongos [25].

O uso de copolímero PVA possui a vantagem de excluir a utilização de substâncias de origem animal nas soluções de vitrificação, além da grande capacidade de inibir a formação de cristais de gelo [22]. A utilização de copolímero PVA nas soluções de vitrificação para oócitos eqüinos não foi descrita até o presente momento.

O desenvolvimento de técnicas de conservação adequadas de oócitos eqüinos associada às técnicas eficientes de maturação e fertilização *in vitro* incrementariam a reprodução assistida na espécie. Com base no exposto, os objetivos do presente estudo foram: 1) determinar, por microscopia confocal, o índice de maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos eqüinos cultivados em meio com adição de eGH, IGF-I ou a associação de ambos; 2) avaliar, por microscopia confocal, características estruturais de oócitos eqüinos submetidos a maturação *in vitro* e vitrificação, com a utilização de copolímero PVA como crioprotetor.

Material e métodos

Todos os produtos utilizados foram obtidos do Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA): com exceção do meio de cultivo de tecidos 199 (tissue culture media – TCM 199) (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y, USA); SFB (Cultilab Mat Cult Cel, Campinas, SP, Brasil); Solução salina fosfatada tamponada – PBS (Nutricel, Campinas, SP, Brasil); Placas de 4 poços (Nunc, Inter Med, German); SuperCool-X1000™ – copolímero PVA (21st Century Medicine, Rancho Cucamonga, California, USA); Conjugado FITC–LCA e meio anti-descolorador – Vectashield (Vector Labs, Inc., Burlingame, CA).

Coleta dos ovários, obtenção e seleção dos oócitos:

Foram utilizados oócitos provenientes de abatedouro, localizado a aproximadamente 30 Km do laboratório - Campus Universitário/UFPel. No período de dezembro de 2003 a fevereiro de 2004 os ovários foram transportados (30-60 min) até o laboratório em caixa térmica (temperatura de 25-30°C); contendo solução salina adicionada de 40 mg/l de sulfato de gentamicina.

No laboratório foi realizada a dissecação da túnica albugínea dos ovários e individualização dos folículos. Os folículos com diâmetro entre 10 e 35mm foram submetidos a três lavagens em solução salina estéril a temperatura de 37°C, sendo mantidos no último compartimento de lavagem até o momento da abertura dos folículos.

Os folículos selecionados foram abertos individualmente em placa de *Petri* estéril (100x20mm), e a parede interna (camada granulosa) foi raspada (*scraping*) com auxílio de cureta. O conteúdo folicular foi examinado em lupa estéreo-microscópica, sob aumento de 40 vezes, para identificação e classificação dos complexos *cumulus oophorus* (CCO).

Os CCO recuperados permaneceram em PBS acrescido de 0,1% de Albumina sérica bovina (BSA), 100UI/ml de penicilina e 50µg/ml de estreptomicina a temperatura de 37°C; para posterior classificação quanto à integridade do ooplasma e caracterização das células do *cumulus oophorus* em: *cumulus oophorus* compacto e outros (expandidos, desnudos e degenerados).

Foram considerados viáveis para a MIV, os oócitos que demonstraram ooplasma homogêneo e no mínimo três camadas de células do COC. O

intervalo entre a obtenção dos ovários no abatedouro e cultivo dos oócitos foi de 3 a 5 horas.

Maturação *in vitro*:

Os oócitos COC selecionados foram submetidos a MIV, incubados a 39°C por 30 horas em atmosfera umedecida e 5% CO₂, sob óleo mineral, em placas de 4 poços contendo 500µl de meio em cada divisão. Foram utilizados no máximo 15 oócitos por poço.

Foram empregados quatro tratamentos de maturação: 1) Meio base: TCM 199, 0,1% de BSA, 100UI/ml de penicilina e 50µg/ml de estreptomicina (n=34); 2) Meio base com adição de 400 ng/ml GH (n=31); 3) Meio base com adição de 200 ng/ml IGF-I (n=35) e 4) Meio base com adição de 400 ng/ml GH + 200 ng/ml IGF-I (n=22).

Subseqüente à maturação, foi realizada retirada das células do *cumulus oophorus* por cuidadosa pipetagem dos oócitos em PBS, contendo 80 UI/ml de hialuronidase. Os oócitos foram avaliados (n=122) quanto à integridade e divididos em dois grupos aleatoriamente. Um grupo foi imediatamente submetido ao processo de fixação (oócitos maturados e fixados, n=37) e o restante foi vitrificado (oócitos maturados e vitrificados, n=85).

O processo de fixação consistiu na retirada da zona pelúcida com a utilização de pronase 0,1% em PBS e fixação dos oócitos em paraformaldeído a 2% por no mínimo 1h a 5°C. A seguir foram realizadas quatro lavagens em solução de bloqueio (PBS com 0,2% Azida sódica e 100mM de glicina) e armazenagem nesta solução a temperatura de 5°C. Os oócitos foram enviados em solução de bloqueio para a Universidade de Davis/ EUA para avaliação por microscopia confocal.

Vitrificação em “palhetas abertas extendidas” (open-pulled straws-OPS):

O protocolo de vitrificação consistiu na exposição dos oócitos a duas soluções de vitrificação (VS1 e VS2) e envase pelo sistema OPS de 0,25ml [18].

Grupos de 2 a 4 oócitos, previamente selecionados e desnudos, foram passados em 5 gotas de PBS acrescido de 0,4% de BSA, equilibrados por três minutos na solução VS1: TCM 199 + 1,4 M DMSO + 1,8 M Etilenoglicol + 1% Copolímero PVA (20% vinil acetato e 80% vinil álcool – Supercoll X-1000™) e transferidos para a solução VS2: TCM 199 + 2,8 M DMSO + 3,6 M Etilenoglicol + 0,6 M sacarose + 1% Copolímero PVA (20% vinil acetato e 80% vinil álcool – SuperCool X-1000™), por 1 minuto, finalizando esse tempo em microgota de 2-3 µl para o envase dos oócitos por capilaridade no sistema OPS. As palhetas contendo os oócitos foram submetidas ao vapor de nitrogênio por três segundos e imersas em nitrogênio líquido. O protocolo utilizado foi descrito por Bertholot *et al.* [26] e modificado por Macedo [24] para a vitrificação de oócitos suínos.

O descongelamento foi realizado pela exposição das palhetas ao ar por cinco segundos e imersão da extremidade que continha os oócitos em solução de 0,5 M de sacarose, onde permaneceram por cinco minutos. Na seqüência, os oócitos foram transferidos respectivamente em gotas de soluções de 0,25 M e 0,125 M de sacarose e PBS acrescida de 0,4% de BSA, permanecendo cinco minutos em cada uma.

As soluções de congelamento e de descongelamento permaneceram a temperatura de 37 °C no momento da utilização.

Após o descongelamento, os oócitos foram submetidos aos mesmos procedimentos de retirada da zona pelúcida, fixação, armazenamento e avaliação por microscopia confocal.

Avaliação dos oócitos por microscopia confocal:

Foram avaliados 122 oócitos por microscopia confocal para determinação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática e observação de alterações estruturais secundárias a vitrificação.

Inicialmente, os oócitos previamente fixados, foram expostos a 0,05 % de Triton-X-100 por 5 minutos, e novamente por 5 minutos a solução de bloqueio.

Para coloração dos grânulos corticais, os oócitos foram expostos a 10 µg/ml de Isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado ao marcador aglutinina *Lens culinaris* (LCA), por 15 minutos.

Para identificação da cromatina, foi realizada incubação a 38°C em 10 µg/ml de Iodeto de Propídio (PI) durante 5 minutos.

Os oócitos foram acondicionados em lâminas. O espaço entre a lâmina e lamínula foi preenchido com meio de montagem anti-descolorador (Vectashield) e selado em sua borda com esmalte modelador.

As amostras foram avaliadas pela técnica de microscopia confocal de varredura a laser através do BioRad MRC 600 (BioRad Labs, Richmond, CA), sendo este microscópio acoplado a um laser de ion de Krypton – argônio; este permite a observação simultânea dos grânulos corticais e da conformação da cromatina celular. O microscópio confocal utiliza um filtro de 543 nm para identificação da fluoresceína presente nos grânulos corticais e um segundo filtro de 637 nm para identificação da coloração vermelha proveniente do IP no DNA. As imagens foram arquivadas em discos óticos magnéticos e cada oócito foi observado em secções óticas com intervalos de 0,1 a 2,0 µm

A avaliação da maturação nuclear é realizada de forma similar a microscopia de fluorescência convencional, utilizando-se os seguintes parâmetros: oócito imaturo ou estágio de vesícula germinal – VG (apresenta núcleo esférico localizado central ou periféricamente no ooplasma), metáfase I – MI (cromossomos arranjados na placa metafisária, localizada na periferia do ooplasma) e metáfase II – MII (cromossomos metafisários na periferia do ooplasma e corpúsculo polar no espaço perivitelínico) [30].

A interpretação da maturação citoplasmática foi realizada através da migração dos grânulos corticais, segundo Carneiro *et al.* [27].

Na avaliação da estrutura, foram considerados oócitos sem alteração aqueles que apresentaram formato arredondado simétrico, sem sinais de lise da membrana plasmática, vacuolização, degeneração ou extravasamento de grânulos corticais e conteúdo intracelular.

Análise Estatística:

A comparação dos índices de oócitos imaturos, MI, MII e total de oócitos que retomaram a meiose (MI + MII) entre os grupos, foi analisada pelo Teste de Fisher, utilizando o programa Statistix 8 (Copyright©2003 Analytical Software).

Resultados

Todos os oócitos foram avaliados por microscopia confocal, o que permitiu a avaliação da estrutura em detalhes e determinação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática simultaneamente (Figura 1).

Na avaliação da maturação oocitária (n=122) após 30 horas de maturação, não foi encontrada diferença estatística ($p>0,05$) no índice de MII entre os grupos (Figura 2). Quando a maturação foi avaliada separadamente nos grupos de oócitos maturados e fixados (n=37) e maturados e vitrificados (n=85), também não foi encontrada diferença no índice de MII (Figura 3 e Tabela 1).

Embora não havendo diferença ($p>0,05$) na retomada da meiose, quando comparada nos diferentes meios de maturação (oócitos maturados e vitrificados), com a adição de 200ng/ml de IGF-I e 400ng/ml de eGH obteve-se um índice 60% de oócitos em MI, e quando somados com os oócitos que atingiram MII, o índice aumenta para 86,7% de oócitos com capacidade de retomada da meiose. Apenas 13,3 % de oócitos desse grupo permaneceram imaturos, em contraste com 34,8% do grupo controle (Figura 4).

Todos os oócitos em MII apresentaram cromossomos organizados na placa metafisária, extrusão do primeiro corpúsculo polar (Figura 5A) e migração de grânulos corticais para a periferia do ooplasma, compatível com a caracterização de maturação citoplasmática (Figura 5B). Já, oócitos em metáfase I (MI) demonstraram organização dos cromossomos, porém os grânulos corticais ainda permaneciam dispersos no ooplasma (Figura 5C). Nos oócitos imaturos a cromatina esférica e os grânulos corticais estavam distribuídos de forma aleatória no citoplasma (Figura 5D).

Foram vitrificados/descongelados 85 oócitos desnudos após a MIV com os quatro grupos de tratamento (Tabela 1). Independente do meio de maturação utilizado, oócitos em MII não apresentaram alterações na

distribuição dos grânulos corticais, os quais permaneceram formando monocamada na periferia do ooplasma após o processo de vitrificação. Não foram observadas alterações na morfologia arredondada simétrica dos oócitos, indicando integridade da membrana plasmática. Não foi identificada vacuolização do citoplasma, assim como sinais de degeneração celular que promovessem perda da estrutura e localização do fuso mitótico, exocitose prematura dos grânulos corticais ou extravasamento do conteúdo intracelular. Essas características descritas foram idênticas na totalidade dos oócitos maturados (n=37) e maturados e vitrificados (n=85).

Discussão

O índice de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos eqüinos na presença de eGH, IGF-I e associação de ambos em relação ao controle, não demonstrou diferença ($p>0,05$).

O índice de MII na presença de 400 ng/ml eGH (20% MII), foi inferior ao descrito anteriormente na espécie eqüina de 44% [8] e 29,8% [9]. Marchal *et al.* [8] utilizou 500ng/ml de eGH em TCM, BSA e estradiol; e não obteve incremento no índice de MII em relação ao controle, utilizando oócitos provenientes de ovários de abatedouro, após 30 horas de cultivo. Resultado similar foi descrito por Fernandes [9] com adição de 100ng/ml de eGH, utilizando meio básico BME: HTF (1:1) e suplementos. A suplementação com estradiol nos trabalhos anteriores pode ter favorecido o avanço da maturação nuclear em relação ao presente estudo.

Dos oócitos maturados em presença de IGF-I, 22,2% chegaram ao estágio de MII e demonstraram maturação citoplasmática. Esses resultados estão abaixo do citado em relação à maturação nuclear, porém próximo ao encontrado para maturação citoplasmática (27,8%) [3].

A associação dos hormônios IGF-I e eGH não aumentou os índices de maturação nuclear e citoplasmáticos no presente trabalho. Foi observada uma tendência ao incremento da retomada da meiose (MI+MII=86,7%), nos oócitos submetidos à associação dos dois hormônios. O alto índice de reinício da meiose encontrado nesse grupo sugere que os índices de MII poderiam ser superiores aumentando-se o tempo de cultivo.

O fator que desencadeia a retomada da maturação oocitária em eqüinos ainda não foi esclarecido, assim como o período de tempo necessário para a conclusão do processo de maturação *in vivo* [4]. *In vitro*, o tempo médio necessário para a maioria dos oócitos encontrar-se nuclearmente maturo oscila entre 28-36 horas [27]. O período de cultivo na espécie eqüina está intimamente relacionado ao sistema de maturação utilizado [3,27].

O presente trabalho é o primeiro que utiliza a associação destes hormônios. Tendo que ser explorado, em pesquisas futuras, o período de maturação ideal para este sistema. As perspectivas são otimistas, tendo como base o alto índice de retomada da meiose atingido com 30 horas de maturação. Mais pesquisas também são necessárias para definição da concentração ideal de eGH nos sistemas de cultivo de oócitos eqüinos *in vitro*.

A utilização do BSA como fonte de suplementação protéica para MIV de oócitos eqüinos, tem sido descrita como responsável por redução significativa na maturação nuclear [28]. Contudo, no presente estudo, o SFB não foi utilizado, por acarretar a adição de outros hormônios e fatores de crescimento não controláveis; devido à variação na composição de diferentes amostras destes soros.

Na avaliação dos oócitos eqüinos submetidos à vitrificação após MIV, não se observou alteração na integridade da estrutura dos oócitos avaliados em relação ao controle (oócitos maturados e fixados), os quais permaneceram com seu formato arredondado característico, indicando integridade da membrana plasmática, ausência de vacuolização, degeneração ou extravasamento de grânulos corticais e conteúdo intracelular; independente do meio de cultivo e estágio de maturação avaliados.

No presente trabalho, os oócitos apresentaram-se viáveis após o processo de vitrificação, pois não apresentaram lesões que os tornariam incapacitados para a fertilização e desenvolvimento.

Em oócitos eqüinos, o etilenoglicol foi o crioprotetor com melhores resultados em relação ao 1,2-propanediol e o glicerol [29]. Em outras espécies foram descritas anormalidades morfológicas em oócitos após exposição e vitrificação utilizando-se etilenoglicol; as principais alterações foram: quebra da zona pelúcida, modificações na forma do oócitos e escoamento do conteúdo do ooplasma para o espaço extracelular [30]. Estas alterações não foram

observadas no presente trabalho, indicando que a utilização de copolímeros PVA nas soluções crioprotetoras permite a manutenção da integridade de oócitos eqüinos após processo de vitrificação/descongelamento.

A adaptação do protocolo de vitrificação utilizado em suínos foi realizada com base nas semelhanças encontradas entre as características oocitárias das espécies, principalmente em relação à quantidade e distribuição dos lipídeos citoplasmáticos [27]. O protocolo utilizado foi descrito por Macedo [24], o seu principal incremento foi à utilização do copolímero PVA. O principal mecanismo do copolímero PVA é a capacidade de inibir a formação de gelo em soluções de congelamento, impedindo a formação do núcleo inicial do cristal de gelo. [22,23].

Pode-se concluir, que não houve diferença no índice de maturação nuclear e citoplasmático de oócitos eqüinos *in vitro* com a adição de eGH, IGF-I e associação de eGH e IGF-I. O protocolo de vitrificação utilizando o copolímero PVA como crioprotetor, mostrou-se viável para oócitos eqüinos maturados *in vitro*, os quais permaneceram com a membrana plasmática íntegra e ausência de vacuolização, degeneração ou extravasamento do conteúdo intracelular.

Referências bibliográficas

- [1] Dell'aquila ME, Choi YS, Minoia P, Traina V, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matures equine oocytes. *Theriogenology* 1997;47:1139-1156.
- [2] Hinrichs K, Williams KA. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod* 1997;57:377-384.
- [3] Carneiro C, 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* 2001;65:899-905.
- [4] Dell'aquila ME, Caillaud M, Maritato F, Martoriati A, Gérard N, Aiudi G, Minoia P, Goudet F. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro* in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reprod Biol End* 2004;

disponível em < <http://www.rbej.com/content/2/1/44>> acesso em : 22 de novembro 2004.

- [5] Buccione R, Schroeder A, Eppig J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 1990;43:543-547.
- [6] Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 1996;45:372-377.
- [7] Tonetta SA, diZerega GS. Intra-ovarian regulation of follicular maturation. *Endocrine Rev* 1989;10:205-229.
- [8] Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gerard N, Mermillod P, Goudet G. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and gh receptor messenger rna expression in equine and porcine species. *Biol Reprod* 2003;69:1013-1022.
- [9] 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. Botucatu, 2004, 129 fl, *Dissertação Mestrado*, UNESP.
- [10] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.
- [11] Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res* 1987;16:205-216.
- [12] Fahy GM, MacFarland DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;21:407-426.
- [13] Hochi S, Kimura K, Ito K, Hirabayashi M. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1995;45:236 (abstr.).
- [14] Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 1996;33:300-310.
- [15] Hurtt AE, Landim-alvarenga F, Seidel GF, Squires EI. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 2000;54:119-128.

- [16] Maclellan LJ, Lane M, Sims MM, Squires EI. Effect of sucrose or trehalose on vitrification of equine oocytes 12h or 24h after the onset of maturation. *Theriogenology* 2001;55:310 (abstr.).
- [17] Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 2002;58:911-919.
- [18] Karow AM. Chemical cryoprotection of metazoan cells. *BioScience* 1991;41:155-160.
- [19] Carroll J, Wood MJ, Whittingham DG. Normal Fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: Protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod* 1993;48:606-612.
- [20] Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, Cappai P. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim Reprod Sci* 1997;48: 247–256.
- [21] Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 1999;38:95–105.
- [22] Wowk B, Leiti E, Rasch CM, Karimi NB, Harris SB, Grefory MF. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000;40:228-236.
- [23] Wowk B, Fahy GM. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. *Cryobiology* 2002;44:14–23.
- [24] Macedo MC. Teste de penetração espermática *in vitro* utilizando oócitos suínos frescos e vitrificados em diferentes sistemas de incubação. Pelotas, 2002, 69fl, *Dissertação Mestrado*, UFPel.
- [25] Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 2004;48:22–35.
- [26] Bertholot F, Botté-Martinat FA, Locatelli A, Perreau C, Terqui M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000;41:116-124.
- [27] Carneiro GF, Liu IK, Hyde K, Anderson GB, Lorenzo PL, Ball BA. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev* 2002;63:451–458.

- [28] Willis P, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of sera, time and hormones. *Mol Reprod Dev* 1991;30:360-368.
- [29] Hochi S, Fujimoto T, Choi Y, Braun J, Oguri N. Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. *Theriogenology* 1994;42:1085-1094.
- [30] Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. *Anim Reprod Sci* 2000;63:159-165.

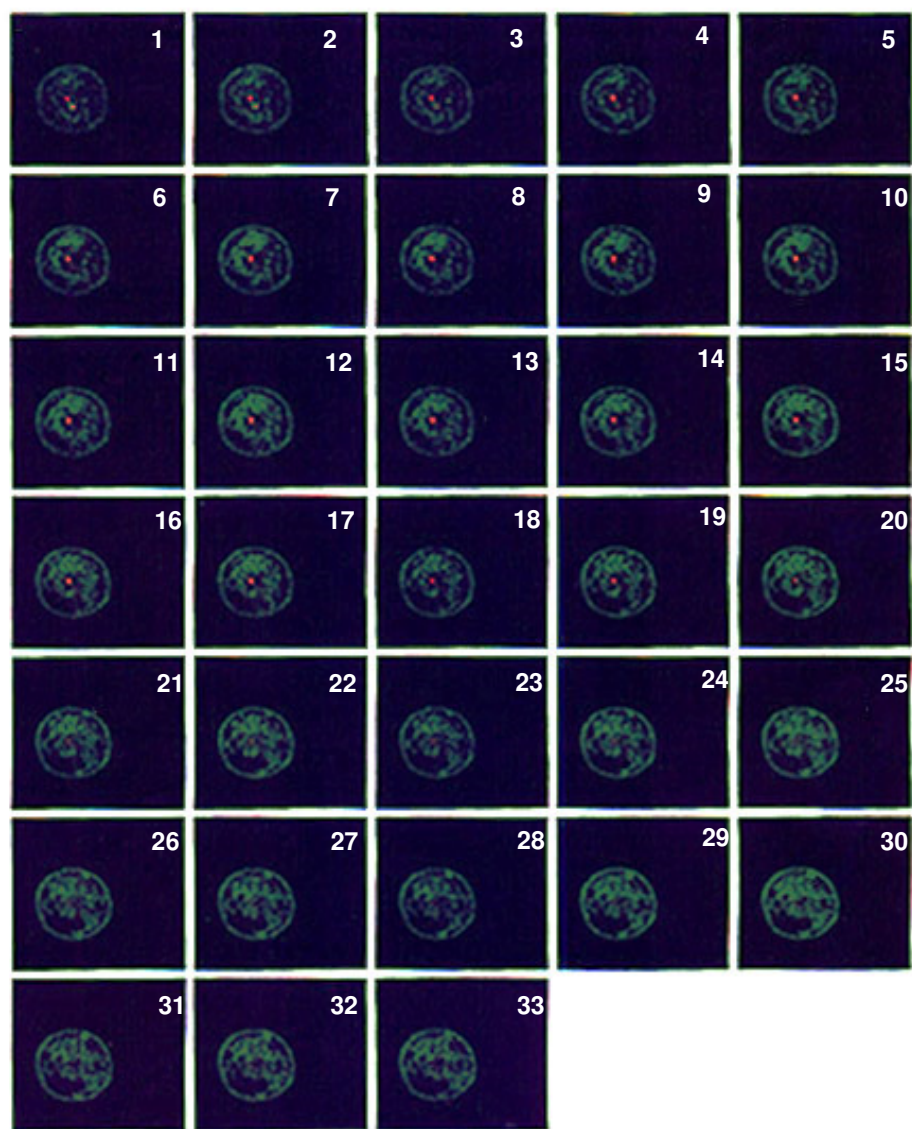


Figura 1 – Cortes seriados 0,1 a 2,0 μm de um oócito eqüino em M II na avaliação por microscopia confocal: 1-4 Observação da placa metafisária, corpúsculo polar e monocamada de grânulos corticais; 5-20 Observação da placa metafisária e monocamada de grânulos corticais; 21-33 Observação da monocamada de grânulos corticais.

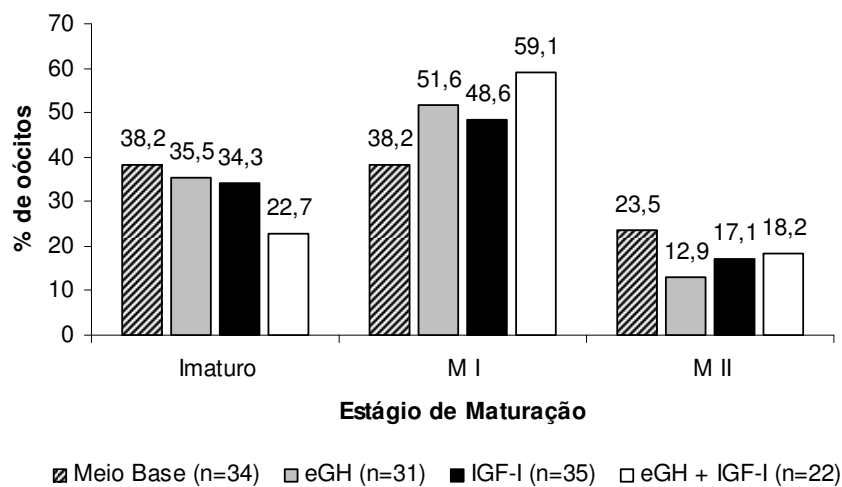


FIGURA 2 – Distribuição de freqüência, de acordo com o estágio de maturação nuclear e citoplasmática, do total de oócitos eqüinos após 30 horas de maturação nos diferentes grupos ($p>0,05$)

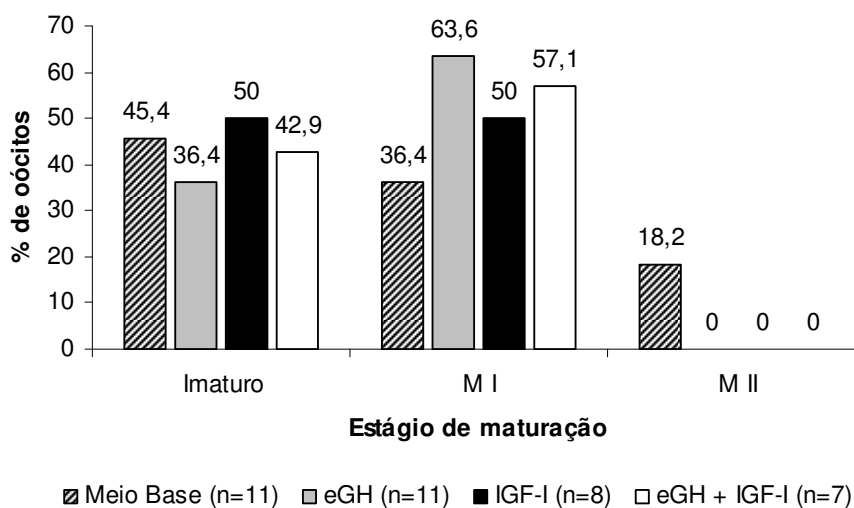


FIGURA 3 – Oócitos eqüinos maturados e fixados, distribuídos de acordo com o estágio de maturação nuclear e citoplasmática, após 30 horas de maturação nos diferentes grupos ($p>0,05$)

TABELA 1 – Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos eqüinos maturados e vitrificados após 30 horas de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Imaturo n (%)	MI n (%)	MII n (%)	Total n (%)
Meio Base	8 (34,8) ^a	9 (39,1) ^a	6 (26,1) ^a	23 (26,1)
eGH	7 (35,0) ^a	9 (45,0) ^a	4 (20,0) ^a	20 (23,5)
IGF-I	8 (29,6) ^a	13 (48,1) ^a	6 (22,2) ^a	27 (31,8)
eGH + IGF-I	2 (13,3) ^a	9 (60,0) ^a	4 (26,7) ^a	15 (17,6)
Total	25 (29,4%)	40(47,1%)	20(23,5%)	85 (100%)

^a Letras iguais nas linhas e colunas demonstram que não houve diferença estatística ($p>0,05$).

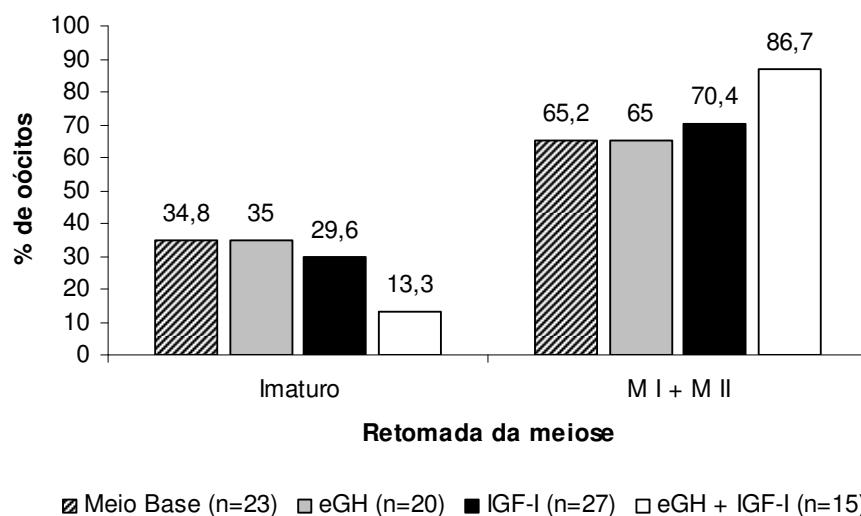


FIGURA 4 – Porcentagem de oócitos eqüinos maturados e vitrificados imaturos e que demonstraram capacidade de retomar a meiose: MI + MII ($p>0,05$).

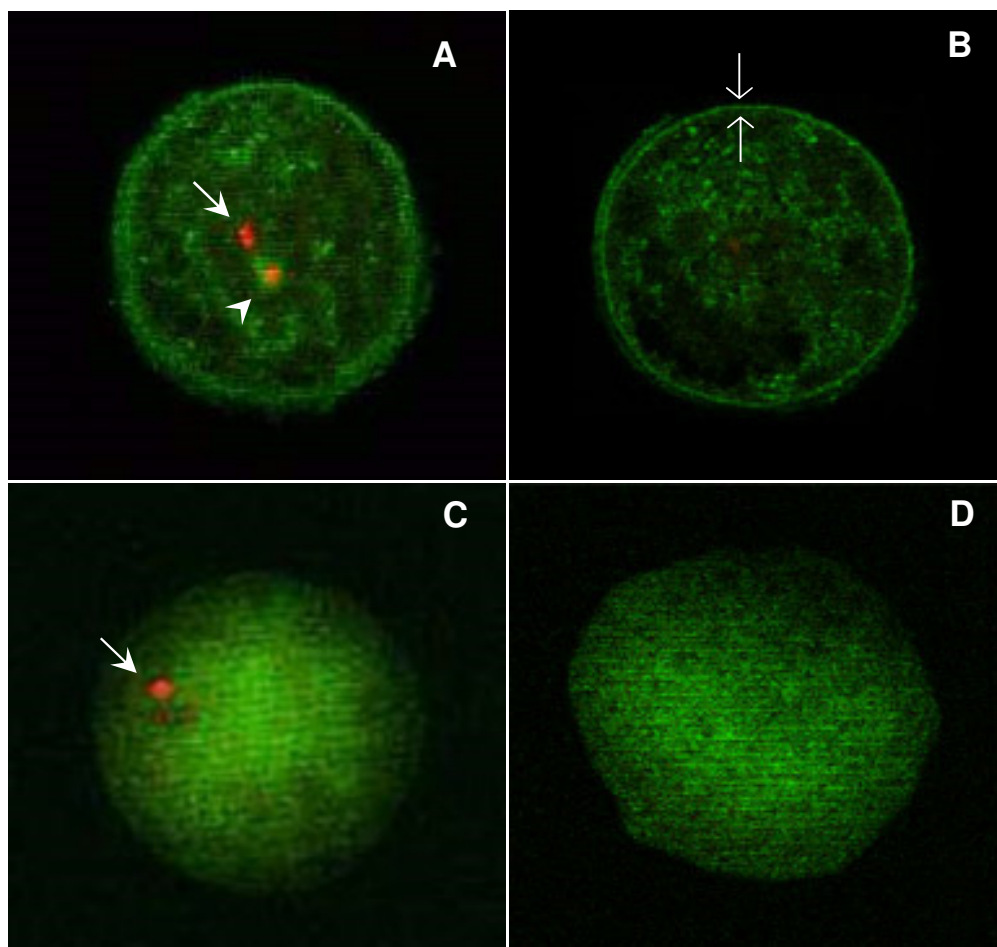


FIGURA 5 – Oócito eqüino em M II com cromossomos organizados na placa metafisária (→) e extrusão do primeiro corpúsculo polar (➤) (A); grânulos corticais organizados em monocamada na periferia do ooplasma (→) (B). Oócito em M I demonstrando cromossomos organizados na placa metafisária (→) (C). Oócito imaturo (D)

CONCLUSÕES GERAIS

- 1) A adição de eGH, IGF-I e associação de eGH e IGF-I não aumentou os índices de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos eqüinos *in vitro*.
- 2) O protocolo de vitrificação, utilizando o copolímero PVA (20% vinil acetato e 80% vinil álcool) como crioprotetor, mostrou-se viável para oócitos eqüinos submetidos à maturação *in vitro*, avaliando-se a integridade dos mesmos por microscopia confocal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASHI, E. Y., RESNICK, C. E., SVOBODA, M. E. Synergistic interactions of somatomedin – C with adenosine 3', 5'-cyclic-monophosphate dependent granulosa cell agonists. **Biology of Reproduction**, v.34, p.81–88, 1986.
- AGUILAR, J. J., WOODS, G. L., MIRAGAYA, M. H., OLSEN, L. M., VANDERWALL, D. K. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v.56, p.745-758, 2001.
- ALI, A., SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v.66, p.901–905, 2002.
- ALM, H., HINRICHS, K. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, p. 215-220, 1996.
- ALM, H., TORNER, H. *In vitro* maturation of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 345, 1994 (abstr).
- APA, R., LANZONE, A., MICELI, F., MASTRANDREA, M., CARUSO, A., MANCUSO, S., CANIPARI, R. Growth hormone induces *in vitro* maturation of follicle- and cumulus-enclosed oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.106, p.207-212, 1994.
- AMAN, R., PARKER, J. Effects of cooling and rewarming on meiotic spindle and chromosome of *in vitro* matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.50, p.103-110, 1994.

- ASADA, M., ISHIBASHI, S., IKUMI, S., FUKUI, Y. Effect of polyvinyl alcohol (copolímero PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.58, p.1199-1208, 2002.
- BACHELOT, A., MONGET, P. IMBERT-BOLLORE, P., COSHIGANO, K., KOPCHICK, J., KELLY, P., BINART, N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v.143, n.10, p.4104-4112, 2002.
- BAKER, J., HARDY, M.P., ZHOU, J., BONDY, C., LUPU, F., BELLVE, A. R., EFSTRATIADIS, A. Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. **Molecular Endocrinology**, v.10, p.903-918, 1996.
- BERTHOLOT, F., BOTTÉ-MARTINAT, F. A., LOCATELLI, A., PERREAU, C., TERQUI, M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. **Cryobiology**, v.41, p. 116-124, 2000.
- 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.
- BODENSTEINER, K. J., WILTBANK, M. C., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.499-512, 1996.
- BRIDGES, T.S., DAVIDSON, T. R., CHAMBERLAIN, C. S., GEISERT, R. D., SPICER, L. J. Changes in follicular fluid steroids, insulin like growth factors (IGF) and IGF binding proteins (IGFBP) and IGFBP proteolytic activity during equine follicular development. **Journal Animal Science**, v.80, p.179-190, 2002.
- BRINSKO, S. P., BALL, B. A., ELLINGTON, J. E. *In vitro* maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. **Theriogenology**, v.44, p.461-469, 1995.
- BRÜCK, I., GREVE, T., HYTTEL, P. Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare. **Anatomy Embryology**, v.199, p.21-28, 1999.
- BRÜCK, I., GRONDAHL, C., HOST, T., GREVE, T. *In vitro* maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. **Theriogenology**, v.46, p.75-84, 1996.

- BUCCIONE, R., SCHROEDER, A., EPPIG, J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.
- CARNEIRO, G. F. Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. **Ciência e Tecnologia Veterinária**, v.2, n.2, p.05-10, 2002.
- CARNEIRO, G. F., LIU, I. K., HYDE, K., ANDERSON, G. B., LORENZO, P. L., BALL, B. A. Quantification and Distribution of Equine Oocyte Cortical Granules During Meiotic Maturation and After Activation **Molecular Reproduction and Development**, v.63, p.451–458, 2002a.
- CARNEIRO, C., 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. **Biology of Reproduction**, v.65, p.899-905, 2001.
- CARNEIRO, G. F., MUNRO, C. J., LEUTENEGGER, C. M., LORENZO, P. L., BALL, B. A., LIU, I. K. Potential relevance of insuline-like growth factor-I (IGF-I) and insuline-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vivo maturation of equine oocytes during follicular growth. **Theriogenology**, v.58, p.685–688, 2002b.
- CARNEVALE, E. M. Gamete intrafallopian transfer. **The Veterinary Clinics of North America (Equine Practice)**, v.12, p.47-60, 1996.
- CARROL, J., DEPYPERE H., MATTHEWS, C. Freeze-thaw induced changes in the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.547-553, 1990.
- CARROLL, J., WOOD M. J., WHITTINGHAM, D. G. Normal Fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: Protective action of certain macromolecules. **Biology of Reproduction**, v.48, p.606-612, 1993.
- CHEN, L., RUSSELL, P. T., LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, p.87-93, 1993.

- CHOI, Y.H., HOCHI, S., BRAUN, J., SATO, K., OGURI, N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and the slicing of ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 959-966, 1993.
- CHOI, Y. H., LOVE, C. C., LOVE, L. B., VARNER, D. D., BRINSKO, S., HINRICHS, K. Developmental competence in vivo and in vitro matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p.455-465, 2002a.
- CHOI, Y. H., SHIN, T., LOVE, C., JOHNSON, C., VARNER, D., WESTHUSIN, M., HINRICHS, K. Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence and activation rates after nuclear transfer. **Theriogenology**, v.57, p.1005-1011, 2002b.
- CNA, 2003. Confederação da agricultura e pecuária do Brasil cria comissão para o setor de agronegócio do cavalo. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/AgropecuariaAgora/Agora03/aq297.htm>> Acesso em: 10 de Nov. 2004
- CRAN, D.G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **J Reproduction Fertility Supplement** v.38, p.49-62, 1989.
- DEKEL, N. Protein phosphorylation/ dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.82-88, 1996.
- DEKEL, N., GAKLIANI, D., BEERS, W. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonatropins at different stages of follicular development. **Biology of Reproduction**, v.38, p.517 – 521, 1988.
- DEL CAMPO, M. R., DONOSO, X., PARRISH, J. J., GINTHER, O. J. Selection of follicles, preculture oocytes evaluation and duration of culture for *in vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v.43, p.1141-1153, 1995.
- DEL CAMPO, M. R., DONOSO, M. X., PARRISH, J. J. *In vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v.20, p.37, 1990 (abstr).
- DELL'AQUILA, M. E., ALBRIZIO, M., MARITATO, F., MINOIA, P., HINRICHS, K. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 68, p.2065-2072, 2003

- DELL'AQUILA, M. E., CAILLAUD, M., MARITATO, F., MARTORIATI, A., GÉRARD, N., AIUDI, G., MINOIA, P., GOUDET, F. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro* in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2004. Disponível em < <http://www.rbej.com/content/2/1/44>> Acesso em : 22 de novembro 2004.
- DELL'AQUILA, M. E., CHOI, Y. S., MINOIA, P., TRAINA, V., FUSCO, S., LACALANDRA, G. M., MARITATO, F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro*-matures equine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p.1139-1156, 1997.
- DELL'AQUILA, M. E., MASTERSON, M., MARITATO, F., HINRICHS, K. Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after ICSI of equine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p. 79-88, 2001.
- DESJARDINS, M., KING, W. A., BOUSQUET, D. *In vitro* maturation of horse oocytes. **Theriogenology**, v.23, p.187, 1985 (abstr).
- DINNYES A., DAI, Y., JIANG, S., YANG, X. High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.63, p.513-518, 2000.
- DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.
- DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.39, p.65-79, 1993.
- DRAETTA, G., LUCA, F., WESTENDORF, J., BRIZUELA, L., RUDERMAN, J., BEACH, D. Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. **Cell**, v.56, p.829-838, 1989.
- DULCIBELLA, T., KURASAWA, S., DUFFY, P., KOPF, G. S., SCHULTZ, R. M. Regulation of the Polyspermy Block in the Mouse Egg: Maturation-Dependent Differences in Cortical Granule Exocytosis and *Zona Pellucida* Modifications Induced by Inositol 1,4,5-Trisphosphate and an Activator of Protein Kinase C'. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1251-1257, 1993.

- DUNPHY, W. G., BRIZUELA, L., BEACH, D., NEWPORT, J. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. **Cell**, v.54, p.423–431, 1988.
- EDWARDS, R. G., FOWLER, R. E., GORE-LANGTON, R. E., GOSDEN, R. G., JONES, E. C., READHEAD, C., STEPTOE, P. C. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.237-263, 1977.
- ELVIN, J. A., YAN, C., MATZUK, M. M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily member in female fertility. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.159, p.1-5, 2000.
- FAHY, G.M., MACFARLAND, D. R., ANGELL, C. A., MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p.407-426, 1984.
- FAHY, G. M., WOWK, B., WU, J., PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v. 48, p.22–35, 2004.
- FAN, H., SUN, G. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, v.70, p. 535–547, 2004.
- FERNANDES C. B. **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**. Botucatu, 2004, 129 fl, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Pós-graduação em Medicina Veterinária, UNESP, 2004.
- FISSORE, R. A., KUROKAWA, M., KNOTT, J., ZHANG, M., SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v.124, p.745-754, 2002.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135-163, 2003.

- FULKA, J. Jr., OKOLSKI, A. Culture of horse oocyte *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.61, p.213-215, 1981.
- GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.61-79, 2000.
- GINTHER, O. J., BEG, M. A., DONADEU, F. X., BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 239–257, 2003
- GINTHER, O. J., BERGFELT, D. R., BEG, M. A., MEIRA, C., KOT, K. *In vivo* effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor I on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, v.70, p.99–105, 2004.
- GIUDICE, L. C. Insulin-Like Growth Factors and Ovarian Follicular Development. **Endocrine Reviews**, v.13, n.4, p.641-669, 1992.
- GOUDET, G., BELIN, F., BEZARD, J., GERARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p. 563–570, 1998.
- GOUDET, G., BEZARD, J., DUCHAMP, G., GERARD N., PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. **Biology of Reproduction**, v.57, p.232-245,1997.
- GRAZUL-BILSKA, A.T., REYNOLDS L. P., REDMER, D. A. Gap junctions in ovaries. **Biology of Reproduction**, v.57, p.947-957,1997.
- GRONDAHL, C., HOST, T., BRÜCK, I., VIUFF, D., BEZARD, J., FAIR, T., GREVE, T., HYTTEL, P. *In vitro* production of equine embryos. **Biology of Reproduction**, v.1, p.299-307, 1995.
- GUTIERREZ, C. G., RALPH, J. H., TELFER, E. E., WILMUT, I., WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1322-1328, 2000.

- HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Feminina. In: HAFEZ, E. S. E., **Reprodução Animal**. São Paulo: Ed. Manole, 1995, p.21-58.
- HARTSHORNE, G. M., SARGENT, I. L., BARLOW, D. H. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. **Human Reproduction**, v.9, p.1003-1012, 1994.
- HAWLEY, L. R., ENDRES, A. C., HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v.1, p. 243-252, 1995.
- HERRINGTON, J., CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **Trends in Endocrinology e Metabolism**, v.12, p. 252-257, 2001
- HERRLER, A., HAHN, L., NIEMANN, H. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.1213-1224, 1992.
- HINRICHS K. The relationship of follicular atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. **Theriogenology**, v.36, p.157-168, 1991.
- HINRICHS, K., LOVE, C. C., BRINSKO, S. P., CHOI, Y. H., VARNER, D. D. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: Effects of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. **Biology of Reproduction**, v.67, p.256-262, 2002
- HINRICHS K., MARTIN M. G., SCHMIDT A. L., FRIEDMANN, P. P. Effects of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p.149-156, 1995.
- HINRICHS K., SCHMIDT A. L., FRIEDMANN P. P., SELGRATH J. P., MARTIN, M. G. *In vitro* maturation of horse oocytes characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biology of Reproduction**, v.48, p.363-370, 1993a.

- HINRICHS, K., SCHMIDT A. L., SELGRATH, J. P. Atlas of chromatin configurations of germinal vesicle-stage and maturing horse oocytes. **Equine Veterinary Journal**, suppl.15, p.60-63, 1993b.
- HINRICHS, K., WILLIAMS, K. A. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biology Reproduction**, v.57, p.377-384, 1997.
- HIRSH, A. G. Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. **Cryobiology**, v.24, p. 214-228, 1987.
- HOCHI, S., FUJIMOTO, T., CHOI, Y., BRAUN, J., OGURI, N. Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. **Theriogenology**, v. 42, p. 1085-1094, 1994.
- HOCHI, S., KIMURA, K., ITO, K., HIRABAYASHI, M. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v.45, p.236, 1995 (abstr).
- HOCHI, S., KOZAWA, M., FUJIMOTO, T., HONDO, E., YAMADA, J., OGURI, N. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. **Cryobiology**, v. 33, p. 300-310, 1996.
- HULSHOF, S. C. J., FIGUEIREDO, L. J. R., BECKERS, J. F., BEVERS, M. M., VAN DER DONK, J. A., VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17,estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.44, p.217-226, 1995
- HURTT, A. E., LANDIM-ALVARENGA, F., SEIDEL, G. F., SQUIRES, E. L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**, v.54, p.119-128, 2000.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREEVE, T. Oocyte growth, capacitation 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

- IRVINE, C. H. G., ALEXANDER, S. L. The dynamics of gonadotrophinreleasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. **The Journal Endocrinology**, v.140, p.283–295, 1994.
- ISACHENKO, V., SOLER, C., ISACHENKO, E., PEREZ-SANCHEZ F., GRISHCHENKO, V. Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and rmoval of cryoprotectant. **Cryobiology**, v.36, p.250-253, 1998
- IZADYAR, F., COLENBRANDER, B., BEVERS, M. M. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.372-377, 1996.
- IZADYAR, F., HAGE, W. G., COLENBRANDER, B., BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.444-453, 1998.
- IZADYAR, F., VAN TOL, H. T. A., COLENBRANDER, B., BEVERS, M. M. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.175–180,1997.
- JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 185–201, 2003.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: JUNQUEIRA, L. C , CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1995, p. 367-388.
- KAROW, A. M. Chemical cryoprotection of metazoan cells. **BioScience**, v.41, p.155-160, 1991.
- KING, W. A., BEZARD, J., BOUSQUET, D., PALMER, E. , BETTERIDGE, K. J. The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares. **Genome**, v.29, p.679-682, 1987.

- LANDIM-ALVARENGA, F. C., RUBIN, M. I. B., SILVA, C. A. M., PONCHIROLLI, C. B., ALVES, D. F., MACLELLAN, L. J. Effects of culture media on *in vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v.57, p.725, 2002.
- LACKEY, B. R., GRAY, S. L. L., HENRICKS, D. M. Physiological basis for use of insulin-like growth factors in reproductive applications: a review. **Theriogenology**, v.53, p.1147-1156, 2000.
- LE GAL, F., MASSIP A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v.38, p.290-300, 1999.
- LI, XI., DAI, Y., ALLEN, W. R. 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. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1391–1396, 2004.
- LIEBERMANN, J., NAWROTH, F., ISACHENKO, V., ISACHENKO, E., RAHIMI, G., TUCKER, M. J. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1671–1680, 2002.
- LÓPEZ-BÉJAR, M., LÓPEZ-GATIUS, F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. **Theriogenology**, v.58, p.1541-1552, 2002.
- LORENZO, P. L., LIU, I. K., ILLERA, J. C., PICAZZO, R. A., CARNEIRO, G. F., ILLERA, M. J., CONLEY, A. J., ENDERS, A. C., ILLERA, M. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. **Journal Physiology and Biochemistry**, v.57, p.15-22, 2001.
- LOVE, L. B., CHOI, Y. H., LOVE C. C., VARVER D. D., HINRICHS, K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. **Theriogenology**, v.59, p.765-774, 2003.
- MACEDO Jr., M. C. **Teste de penetração espermática *in vitro* utilizando oócitos suínos frescos e vitrificados em diferentes sistemas de incubação.** Pelotas, 2002, 69fl, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFPel, 2002.

- MACLELLAN, L. J., CARNEVALE, E. M., COUTINHO DA SILVA, M. A., SCOGGIN, C. F., BRUEMMER, J. E., SQUIRES, E. L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**, v.58, p.911-919, 2002.
- MACLELLAN, L. J., LANE, M., SIMS, M. M., SQUIRES, E. L. Effect of sucrose or trehalose on vitrification of equine oocytes 12h or 24h after the onset of maturation. **Theriogenology**, v.55, p.310, 2001(abstr).
- MAO, J., WU, G., SMITH, M. F., MCCAULEY, T.C., CANTLEY, T. C., PRATHER, R. S., DIDION, B. A., DAY, B. N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1197-1203, 2002.
- MARCHAL, R., CAILLAUD, M., MARTORIATI, A., GERARD, N., MERMILLOD, P., GOUDET, G. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1013–1022, 2003.
- MARTINO, A., SONGASEN, N., LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996.
- MEZZALIRA, A., VIEIRA, A. D., CRUZ, F. B., BARBIERI, D. T., DAMIANI, J. C. Vitrificação de ovócitos bovinos com a utilização de micropipetas de vidro ou paletas estiradas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.2, p.108-114, 2002.
- MONGET, P., FABRE, S., MULSANT, P., LECERF, F., ELSEIN, J. M., MAZERBOURG, S., PISSELET C., MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.139–154, 2002.
- MONNIAUX, D., MONGET, P., BESNARD, N., HUET, C., PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v.47, p.3-12, 1997.
- NAITANA, S., LEDDA, S., LOI, P., LEONI, G., BOGLIOLO, L., DATTENA, M., CAPPAL, P. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in

vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science** v.48, p.247–256, 1997.

NEUMANN H, ALM H, SCHNURRBUSCH U, TORNER H, GREISING T, KANITZ W. The ultrastructure of equine oocytes before and after in vitro maturation. **Reproduction of Domestic Animals**, v.30, p.428, 1995 (abstr).

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

OTOI, T., YAMAMOTO, K., SUZUKI, T. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved with ethylene glycol and sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.

PAPIS, K., SHIMIZU, M., IZAIKE, Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.51, p.173, 1999 (abstr).

PEREIRA, J. M. **Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos: Influência do tempo, LH e FSH.** Santa Maria, 1997, 89f, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, 1997.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, p.193-210, 2001.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: McKINNON, A. O. , VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.161-171.

RALL, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.387-402, 1987.

RALL, W. F., REID, D. S., POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**, v.21, p.106-121, 1984.

REUBINOFF, B.E., PERA, M. F., VAJTA, G., TROUNSON, A. O. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. **Human Reproduction**, v.16, p.2187–2194, 2001.

- SANTOS, M.R. **Criopreservação de ovócitos bovinos por vitrificação**. Lages, 2005, 29 fl, Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UDESC, 2005.
- SCHELLANDER, K., PELI, J., SCHMOLL F., BREM, G. Effects of cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.42, p.909-915, 1994.
- SHABPARED, V., SQUIRE, E. L., SEIDEL, G. E. , JASKO, D. J., Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro, **Theriogenology**, v.40, p. 1161-1175, 1993.
- SHIOYA, Y., KUWAYAMA, M., FUKUSHIMA, M., IWASAKI S., HANADA, A. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.30, p. 489-496, 1988.
- SINGH, B., BARBE, G.J., ARMSTRONG, D.T. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.36, p.113-119, 1993.
- SMAILI, S. S. Microscopia de fluorescência. **Ciência Hoje**, v.29, n.170, p.67-69, 2001.
- SIRARD, M. A., 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, M. A., 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.
- SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: A control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1223–1230, 2004.
- SPICER, L. J., ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.223–245, 1995.

- SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **The Veterinary Clinics of North America (Equine Practice)**, v.12, p.31-45, 1996.
- SQUIRES, E. L., CARNEVALE, E. M., McCUE, P. M., BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.
- SOBAJIMA, T., AOKI, F., KOHMOTO, K. Activation of mitogenactivated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p.389–394,1993.
- SOMMERFELD, V., NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95–105, 1999.
- TESTART, J., LASSALLE, B., FRYDMAN, R., BELAISCH, J. C. A study of factors affecting the success of human fertilization *in vitro*. II. Influence of semen quality and oocyte maturity on fertilization and cleavage. **Biology of Reproduction**, v.28, p.425-431, 1983.
- VAN DEN HURK, R., BEVERS, M. M., BECKERS, J. F. *In vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.
- VATJA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.357-364, 2000.
- VATJA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P. J., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H. Open pulled straws (OPS): A new way to reduce cryoinjures of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.
- VENDOLA, K., ZHOU, J., ADESANYA, O., WEIL, S., BONDY, C. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.12, p.2622–2629, 1998.
- WANG, H., ANDOH, K., HAGIWARA, H., XIAOWEI, L., KIKUCHI, N., ABE, B., YAMADA, K., FATIMA, R., MIZUNUMA, H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. **Endocrinology**, v.142, n.11, p.4930–4936, 2001.

- WEEB, R., CAMPBELL, B. K., GARVERICK, H. A., GONG, J. G., GUTIERREZ, C. G., ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulation follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 54, p.33-48, 1999,
- WILLIS, P., CAUDLE, A. B. Fayrer-Hosken RA. Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of sera, time and hormones. **Molecular Reproduction Development**, v.30, p. 360-368, 1991.
- WOWK, B., FAHY, G. M. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. **Cryobiology**, v.44, p.14–23, 2002.
- WOWK, B., LEITI, E., RASCH, C. M., KARIMI, N. B., HARRIS, S. B., GREFFORY, M. F. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v.40, p.228-236, 2000.
- WU, J., NAYUDU, P. L., KIESEL, P. S., MICHELMANN, H. W. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.63, p.320-327, 2000.
- ZACZEK, D., HAMMOND, J., SUEN, L., WANDJI, S., SERVICE, D., BARTKE, A., CHANDRASHEKAR, V., COSCHIGANO, K., KOPCHICK, J. Impact of Growth Hormone Resistance on Female Reproductive Function: New Insights from Growth Hormone Receptor Knockout Mice. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1115–1124, 2002.
- ZHANG, J. J., BOYLE, M. S., ALLEN, W. R., GALLI, C. Recent studies on *in vivo* fertilisation of *in vitro* matured horse oocytes. **Equine Veterinary Journal**, Suppl.26, p.101-104,1989.
- ZHANG, J. J., MUZS, L. Z., BOYLE, M. S. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.26, p.361-365, 1990.
- ZUELKE, K. A., BRACKETT, B. G. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell inclosed and desnud oocytes after *in vitro* maturation with luteinzing hormone. **Biology of Reproduction**, v.48, p.815-820, 1993.