



PRINCIPAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM BOVINOS: DA OOGÊNESE À MATURAÇÃO *IN VITRO*

Michelle Silva Araujo¹, Midyan Daroz Guastali², Rodrigo Volpato³, Fernanda da Cruz Landim⁴

1. Mestranda em Biotecnologia Animal pela Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu (msa.vet@hotmail.com)
2. Doutoranda em Biologia Geral e Aplicada pela Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu
3. Doutorando em Biotecnologia Animal pela Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu
4. Professora Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

Apesar dos esforços realizados visando melhorar a produção de embriões bovinos *in vitro*, sua eficiência ainda é baixa, uma vez que apenas 30 a 40% dos blastocistos desenvolvidos são obtidos de oócitos após a maturação *in vitro* (MIV), fertilização e cultivo dos embriões. As tecnologias reprodutivas assistidas têm um impacto limitante devido à falta de oócitos aptos à fertilização. A compreensão dos mecanismos envolvidos na maturação oocitária é crucial para o estabelecimento de um sistema de cultivo que possibilite a produção de um maior número de embriões de boa qualidade. O estudo dos estágios iniciais do desenvolvimento oocitário e folicular *in vivo* é importante para um melhor entendimento das vias moleculares que regulam a oogênese, a foliculogênese e a maturação oocitária. Desta forma, os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na maturação poderão contribuir com o aumento na eficiência da produção de embriões *in vitro*. Portanto, o objetivo desta revisão de literatura é entender os principais mecanismos que permeiam a maturação oocitária em bovinos, desde o processo de formação do oócito e das células foliculares *in vivo*, até a sua utilização no ambiente *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Maturação *in vitro*, oócito, oogênese, reprodução

MAJOR MECHANISMS INVOLVED IN OOCYTE MATURATION IN CATTLE: SINCE OOGENESIS TO *IN VITRO* MATURATION

ABSTRACT

Despite the efforts made to improve the production of bovine embryos *in vitro*, their efficiency is still low, since only 30-40% of developed blastocysts are obtained from oocytes after *in vitro* maturation (IVM), fertilization and cultured embryos. Assisted reproductive technologies have a limiting impact due a lack of oocytes capable to fertilization. The comprehension of mechanism involved in oocyte maturation are crucial to establish a culture system that allows a larger number production of good quality embryos. The study of the early stages of oocyte and follicle development *in vivo* is important for a better understanding of the molecular pathways that regulate

oogenesis, folliculogenesis and oocyte maturation. Thus the physiological biochemical and molecular mechanisms involved in maturation may contribute to the increased efficiency of *in vitro* embryo production. Therefore, the aim of this literature review is to understand the basic mechanisms that underlie oocyte maturation in cattle, since oocyte and follicle cells *in vivo* formation to its use in the *in vitro* environment.

KEYWORDS: *in vitro* maturation, oocyte, oogenesis, reproduction

INTRODUÇÃO

A eficiência dos processos de maturação *in vitro* (MIV), fertilização de oócitos e desenvolvimento de embriões ainda não é alta o suficiente. O número de gestações obtido quando os embriões transferidos são produzidos *in vitro* é menor em relação aos embriões produzidos *in vivo*. Apesar dos esforços realizados visando melhorar a produção de embriões bovinos *in vitro*, sua eficiência ainda é baixa, uma vez que apenas 30 a 40% dos blastocistos desenvolvidos são obtidos de oócitos após a MIV, fertilização e cultivo dos embriões (SIRARD et al., 2006).

Tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo*, somente oócitos competentes podem retomar a meiose e adquirir a habilidade de serem fertilizados. O estresse oxidativo, toxinas e as condições de cultivo *in vitro* podem promover profundos efeitos na competência genética dos oócitos maturados *in vitro* (CARREL et al., 2005).

As tecnologias reprodutivas assistidas, tais como a fertilização *in vitro*, transferência de embriões, transgenia e clonagem; quando aplicadas a mulheres inférteis, animais de produção e em vias de extinção; tem um impacto limitante devido à falta de oócitos aptos à fertilização. A MIV de oócitos imaturos provenientes de folículos antrais é um método alternativo para aumentar o número de oócitos que poderão ser fertilizados (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Os folículos primordiais são o tipo folicular de maior abundância presente nos ovários. A possibilidade de iniciar o crescimento destes folículos em cultivo celular, até o estágio em que o oócito possa ser maturado e fertilizado, irá aumentar consideravelmente o potencial reprodutivo dos mamíferos. Fatores de sinalização trocados entre os oócitos e as células da granulosa que o circundam, são essenciais para a indução e regulação da diferenciação folicular e para o desenvolvimento de um oócito que será competente, podendo ser submetido à fertilização e à subsequente embriogênese (VAN DEN HURK et al., 2000; EPPIG, 2001; MATZUK et al., 2002).

O conhecimento dos fatores que regulam o desenvolvimento oocitário e das células foliculares que o circundam é importante para o reconhecimento e entendimento das aberrações durante o desenvolvimento folicular, e para o aprendizado da fisiologia necessária para o sucesso da produção de embriões *in vitro*. Além disso, a compreensão dos mecanismos envolvidos na maturação oocitária é crucial para o estabelecimento de um sistema de cultivo que possibilite a produção de um maior número de embriões de boa qualidade (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; GOTTARDI & MINGOTI, 2009).

Portanto, o objetivo desta revisão de literatura é entender os principais mecanismos que permeiam a maturação oocitária em bovinos, desde o processo de formação do oócito e das células foliculares *in vivo*, até a sua utilização no ambiente *in vitro*.

REVISÃO DE LITERATURA

Oogênese

O processo de formação dos oócitos inclui sete etapas: formação das células germinativas primordiais (CGPs); migração das CGPs para as futuras gônadas; colonização das gônadas pelas CGPs; proliferação das CGPs; diferenciação das CGPs em oogônia; início da meiose; e parada no estágio de diplóteno da prófase I da meiose (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Os oócitos têm origem nas CGPs, as quais derivam do mesoderma extraembrionário e dependem de sinais provenientes do ectoderma extraembrionário e do endoderma visceral para o seu desenvolvimento inicial. A migração, proliferação e colonização das gônadas em desenvolvimento pelas CGPs são controladas por vários fatores e dependem também da interação entre as CGPs e as células somáticas que as circundam. Dentre estes fatores estão os membros da família do fator transformador de crescimento β (TGF β), como a proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4), a BMP-8b e a BMP-2; sendo importantes para a formação das CGPs e regulação da expressão de genes (YING et al., 2001; SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

As CGPs se proliferam e migram a partir do endoderma do saco vitelínico para a região da crista gonadal. A crista gonadal é formada por volta do dia 30 do desenvolvimento embrionário nos bovinos. Há controvérsias se esta migração é mediada por movimentos ameboides ou se estas células são levadas pelo movimento de tecidos adjacentes que estão em crescimento (FREEMAN, 2003; AERTS & BOLS, 2010). Acredita-se que a migração das CGPs é orientada pelo contato entre o receptor c-kit, expresso na superfície destas células, e o seu ligante, o Kit ligante (também referenciado como fator da célula-tronco) expresso nas células somáticas que formam o substrato para a migração das CGPs para a crista gonadal (EDDY et al., 1981; FLEISCHMAN, 1993).

A diferenciação sexual se inicia, aproximadamente, durante o período de migração das CGPs para a crista gonadal (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012). Os cromossomos sexuais determinam a diferenciação das CGPs em oogônia ou espermatogônia, as quais apresentam uma alta atividade mitótica e de transcrição (PICTON et al., 1998). A presença do cromossomo XY promove a diferenciação da gônada em testículo, a partir da influência do gene determinante do sexo ligado ao cromossomo Y (SRY). O cromossomo XX, por não apresentar o gene SRY, é o responsável pela formação dos ovários (KOOPMAN et al., 1991).

Nos ovários, as CGPs vão realizar sucessivas divisões mitóticas, resultando na formação de grupos de oogônias conectadas umas às outras por pontes citoplasmáticas e rodeadas por células somáticas derivadas dos mesonéfrons, formando aglomerados de células germinativas (SAWYER et al., 2002; PEPLING, 2006). Posteriormente, porém antes da formação folicular, as divisões mitóticas cessam e as divisões meióticas das células germinativas se iniciam, entre os dias 75 e 80 de vida embrionária dos bovinos, dando origem aos oócitos primários (GINSBURG, 1990; SMITZ & CORTVRINDT, 2002). Os oócitos passam pelos estágios de leptóteno, zigóteno e paquíteno, da prófase I da meiose, antes de pararem na fase de diplóteno (PICTON et al., 1998). Neste estágio, os cromossomos são descondensados e circundados por uma membrana nuclear, formando a vesícula germinativa (SMITZ & CORTVRINDT, 2002). Os oócitos permanecem na fase de diplóteno da primeira divisão meiótica até que os folículos entrem em atresia ou até que folículos maduros encontrem uma onda de hormônio luteinizante (LH), o

que permite que o oócito complete a meiose (na maioria dos mamíferos) e se torne uma célula haploide (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

Foliculogênese

Concomitante à parada da meiose, os aglomerados de células germinativas se desfazem para dar início à formação dos folículos (PEPLING, 2006). Ainda não há informações precisas sobre como isto acontece (TINGEN et al., 2009). Os oócitos são circundados por uma camada de células somáticas pavimentosas, denominadas células da pré-granulosa, para darem origem aos folículos primordiais (PICTON, 1998). Na maioria das espécies, as células da pré-granulosa e também as células da granulosa são de origem das células epiteliais superficiais e de células derivadas dos mesonéfrons (SAWYER et al., 2002). No dia 90 de gestação já é possível detectar os folículos primordiais nos ovários de embriões bovinos (YANG & FORTUNE, 2008).

As células foliculares primordiais permanecem em relativa quiescência até pouco antes da puberdade; quando os ovários se tornam responsivos ao hormônio gonadotrófico (SOYAL et al., 2000). O mecanismo que controla a diferenciação das células da pré-granulosa em granulosa, durante a ativação dos folículos primordiais e subsequente proliferação das células da granulosa, ainda é desconhecido, porém, sabe-se que moléculas como o kit ligante e seu receptor c-kit, fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) e a BMP-15 fazem parte deste mecanismo (OKTEM & OKTAY, 2008; FORTUNE, 2003; MONIRUZZAMAN & MIYANO, 2010).

O crescimento e desenvolvimento dos folículos primordiais para folículos ovulatórios envolvem a diferenciação e proliferação das células foliculares, bem como aumento do diâmetro oocitário (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997). Os folículos primordiais vão originar os folículos primários, fazendo com que as células da granulosa pavimentosas passem a ter aspecto cuboide (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012). O equilíbrio entre fatores inibitórios e estimulatórios sistêmicos e/ou de origem local, tais como o hormônio anti-Mulleriano (fator inibitório) e a ativina – A (fator estimulatório), parece regular a ativação dos folículos primordiais para dar origem aos folículos primários (LI et al., 1994; DURLINGER et al., 2002).

A transição de folículos primários para folículos secundários é mediada por fatores parácrinos intraovarianos produzidos pelos oócitos e suas células da teca e granulosa (KOL et al., 1995). Quando duas ou mais camadas de células da granulosa se desenvolvem, são formados os folículos secundários. Neste estágio o oócito entra em uma fase de crescimento, as células da granulosa circunjacentes se proliferam e a camada da teca se desenvolve ao redor da granulosa a partir das células do estroma intersticial. Em bovinos, os folículos secundários podem alcançar um diâmetro de aproximadamente 150 µm, enquanto que o diâmetro máximo do oócito é de 60 µm (VAN DEN HURK, et al., 1997).

Os oócitos precisam crescer, se tornarem competentes, serem capazes de terminar a maturação nuclear, serem fertilizados e realizarem a clivagem celular. Durante o seu aumento de volume os oócitos também se diferenciam, sendo requerida uma complexa organização citoplasmática devido à produção de novos genes e organelas, e à modificação e redistribuição das já existentes (PICTON et al., 1998).

Durante o seu crescimento, o oócito secreta uma glicoproteína de membrana que dará origem à zona pelúcida. A zona pelúcida forma uma camada protetora ao redor do oócito e consiste em três glicoproteínas: ZP1, ZP2 e ZP3, com a expressão da ZP2 já acontecendo em folículos primordiais. As células da granulosa se

acoplam, formando as junções gap com o oócito, que atravessam a zona pelúcida (SOYAL et al., 2000). As junções gap facilitam a comunicação bidirecional e permitem a transferência de nutrientes, aminoácidos, nucleotídeos, hormônios, fatores de crescimento e sinais estimuladores e inibidores da meiose. Por meio das junções gap ou pelo contato célula-célula na superfície celular, o oócito em crescimento pode promover o crescimento e a diferenciação das células foliculares, enquanto as células da granulosa asseguram o crescimento e diferenciação do oócito (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

O início da formação do antro, a formação total da zona pelúcida, a diferenciação da teca externa e o aumento do número de camadas de células da granulosa caracterizam o folículo terciário. Os folículos antrais grandes, também conhecidos como folículos de Graff, tem um antro folicular bem formado, com diferenciação das células da granulosa em compartimentos de células do cúmulo e murais, o que confere ao oócito competência em retomar a meiose (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; AERTS & BOLS, 2010; SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

O fluido antral serve como fonte de substâncias regulatórias ou inibitórias provenientes do sangue ou de secreções das células foliculares, como gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas. Durante o desenvolvimento folicular, a produção do fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade de vasos sanguíneos, que acompanham um grande aumento de tamanho dos folículos antrais. Os sinais para a formação do antro ainda não estão totalmente elucidados (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Estudos *in vitro* com folículos de roedores demonstraram que o hormônio folículo estimulante (FSH) (MAO et al., 2002), o LH (CORTVRINDT et al., 1998), a ativina (ZHAO et al., 2001) e o Kit ligante (DRIANCOURT et al., 2000) são os prováveis envolvidos neste processo. Estudos *in vitro* com folículos secundários de bovinos demonstraram o efeito estimulante do fator de crescimento epidermal (EGF) na formação do antro (GUTIERREZ et al., 2000).

A competência do oócito em retomar e concluir a meiose e desenvolver um blastocisto após a fertilização é significativamente aumentada durante a dominância folicular e particularmente após a luteólise, através de um processo denominado capacitação oocitária. Durante este processo o envelope nuclear se torna ondulado e o núcleo remanescente exibe um vacúolo de tamanho crescente. Assim, após o término da transcrição oocitária, o oócito não entra em quiescência, mas se prepara para uma possível continuação do seu desenvolvimento em embrião após a fertilização (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Maturação oocitária

A maturação oocitária em mamíferos é definida como a sequência de eventos que ocorrem desde o estágio de vesícula germinativa até o término da segunda divisão meiótica, com formação do segundo corpúsculo polar (BLANCO et al., 2011).

Durante o período que compreende a onda de LH e a ovulação, o oócito passa por uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas concomitantes ao seu crescimento (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

Os oócitos podem ser classificados como competentes ou incompetentes em retomar a meiose (ARLOTTO et al., 1996). Oócito competente é aquele que, por definição, é capaz de sustentar todo o desenvolvimento embrionário (BREVINI-GANDOLFI & GANDOLFI, 2001). A competência meiótica é adquirida durante a foliculogênese e coincide com a formação do antro (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

Esta competência está intimamente relacionada ao tamanho do oócito, que por sua vez é correlacionado com o tamanho folicular. Os oócitos de bovinos precisam ter diâmetro de 110µm ou mais para completarem a maturação nuclear até o estágio de metáfase II (ARMSTRONG, 2001; BLANCO et al., 2011).

A despeito da adequada maturação nuclear, outros processos estão acontecendo dentro do citoplasma do oócito, os quais requerem um desenvolvimento completo para que ocorra a fertilização. O sucesso desses processos é independente da maturação nuclear, e está intimamente relacionado à maturação citoplasmática. Oócitos que não completam adequadamente a sua maturação citoplasmática são incapazes de completar os processos normais do desenvolvimento oocitário (KRISHER et al., 2004).

In vivo, a retomada da meiose é iniciada pela onda pré-ovulatória de LH, acontecendo somente em oócitos meioticamente competentes provenientes de folículos dominantes. Antes e no momento da onda de LH o oócito é circundado pelas células compactas do cúmulo. Momentos antes da onda de LH, as junções gap existentes entre as células do cúmulo e o oócito se desfazem (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

A inibição da secreção de LH ou a inativação dos receptores de LH previne a maturação oocitária e promove falha na ovulação do oócito. Uma vez que nenhum receptor de LH é detectado nos oócitos, os sinais que desencadeiam a maturação oocitária são provenientes das células foliculares que o circundam (PENG et al., 1991, VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Os folículos respondem à onda de LH mudando a produção de esteroides pelas células da granulosa e produzindo ácido hialurônico pelas células do cúmulo. O ambiente de predominância estrogênica agora passa a ter predominância progesterônica; e o ácido hialurônico produzido leva à mucificação e expansão das células do cúmulo, bem como ao rompimento das junções comunicantes existentes entre estas células e o oócito (PICTON et al., 1998).

Maturação nuclear

A maturação nuclear é caracterizada pela habilidade do oócito em retomar a meiose até o estágio de metáfase II, podendo ser observada pela extrusão do segundo corpúsculo polar e pelo aparecimento da segunda placa metafásica (WATSON, 2007; BLANCO et al., 2011). Ela dura, em média, 24 horas nos bovinos e inclui várias etapas, dentre as quais duas divisões consecutivas (fases M) na ausência de replicação do DNA (fase S). Os oócitos são mantidos em metáfase II até a fertilização, quando a ativação do estímulo realizado pela penetração do espermatozoide desencadeia o término do ciclo da meiose e inicia o desenvolvimento embrionário (VAN DEN HURK et al., 1999; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

A base molecular que rege o processo de maturação do oócito em resposta ao pico de LH envolve várias vias regulatórias, tais como a alteração da fosforilação de proteínas, o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e os níveis de cálcio (BORNSLAEGER et al., 1986; HOMA, 1995; GORDO et al., 2001).

Sabe-se que uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação está envolvida na regulação da retomada da meiose e que a proteína denominada fator promotor da maturação (MPF) é a responsável pelo início da maturação oocitária, uma vez que a sua ativação precede ou ocorre concomitantemente à quebra da vesícula germinativa (GORDO et al., 2001). A ativação do MPF promove a fosforilação de proteínas que dão origem ao envelope nuclear e àquelas envolvidas

com a condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (TROUNSON et al., 2001). As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) também estão envolvidas no processo de maturação oocitária, sendo sua atividade requerida durante a maturação para manter a atividade do MPF, formação do fuso meiótico e manutenção da parada da meiose em metáfase II (HASHIMOTO et al., 1994; TROUNSON et al., 2001).

O aumento dos níveis de cAMP no oócito de mamíferos é de grande importância para a maturação meiótica, já que promove o bloqueio da meiose (CONTI et al., 1998). Desta forma, a perda das junções gap entre o oócito e as células do cúmulus, devido ao pico de LH, pode ser o desencadeador da retomada da meiose, pois impede o fornecimento de cAMP derivado das células da granulosa, e assim reduz a concentração de cAMP dentro do oócito (CARABATSOS et al., 2000).

A onda de LH não só ativa a adenilato ciclase, para promover um aumento do cAMP, mas também estimula rápido aumento do cálcio intracelular nas células do cúmulus pela ativação da fosfolipase C. A mobilização do cálcio intracelular é seguida por um influxo de cálcio do meio extracelular. Nos animais domésticos, o pico de LH induz sinais de alta frequência de cálcio nos oócitos, a síntese de ciclinas e, possivelmente, de outras proteínas do ciclo celular. É proposto que a modificação das ciclinas pelo sinal de cálcio é requerida para a ativação completa do MPF na presença de quinases dependes de ciclina, resultando na quebra da vesícula germinativa (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Maturação citoplasmática

A competência de desenvolvimento está relacionada com a maturação citoplasmática do oócito, e se refere à capacidade do oócito em ser fertilizado e produzir um embrião saudável, capaz de continuar o seu desenvolvimento, culminando com o nascimento de um indivíduo. A maturação citoplasmática é adquirida após o oócito se tornar meioticamente competente (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

Esta fase inclui sucessivas transformações, como a migração das mitocôndrias para a posição perinuclear, acúmulo de grânulos corticais ao longo do oolema e redistribuição de organelas; sendo todas necessárias para a progressão da maturação e bloqueio da polispemia (HYTTEL et al., 1997; BLANCO et al., 2011, VAN DEN HURK & ZHAO, 2012). A correta posição das organelas é relevante, pois oócitos bovinos de menor qualidade falham em transferir a mitocôndria da periferia para o centro do citoplasma (STOJKOVIC et al., 2001).

As mitocôndrias, por fosforilação oxidativa do metabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos do citoplasma, são as responsáveis pela produção de grande parte da energia celular em forma de ATP. Uma grande concentração de mitocôndrias geralmente é encontrada nos oócitos, para suportar a taxa mais elevada de síntese de moléculas dos processos fisiológicos envolvidos com a maturação e divisão celular (WILDING et al., 2001). O desenvolvimento anormal ou bloqueio do desenvolvimento embrionário tem sido correlacionado à incapacidade das mitocôndrias de aumentarem e/ou acumularem ATP (STEUERWALD et al., 2000).

Os grânulos corticais presentes no ooplasma são vesículas secretoras não renováveis, uma vez que seu conteúdo não é mais sintetizado após a liberação desencadeada pela penetração do espermatozoide no ovócito. São constituídos por proteases, glicosidases, enzimas e proteínas estruturais, que contribuem na modificação da zona pelúcida, oferecendo barreira física e bioquímica para o

bloqueio da polispermia. Os grânulos corticais podem ser identificados inicialmente como pequenos grupos no citoplasma dos oócitos em estágio de vesícula germinativa. Com o avanço da maturação, sua migração ocorre para a periferia do oócito (WESSEL et al., 2001).

A maturação citoplasmática também é importante para que o oócito bloqueie a polispermia, descondense o espermatozoide que conseguiu penetrar o oócito e para formação do pronúcleo após a fertilização (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Neste processo também estão envolvidas proteínas como o fator de crescimento do pronúcleo masculino (MPGF) e o promotor de crescimento da maturação (MPF). Além disso, há o início da mucificação e expansão das células que circundam o oócito e da redução no número de junções intercelulares entre as células da granulosa e o oócito, o que interrompe o transporte iônico entre as células do cúmulo e o oócito (HYTTEL et al., 1997).

As proteínas do citoesqueleto e distribuição das organelas são importantes para a maturação oocitária e podem afetar a competência do oócito (SUN & SCHATTEEN, 2006; BREVINI et al., 2007). As dinâmicas do citoesqueleto também estão relacionadas com a competência de desenvolvimento do oócito (BREVINI et al., 2007).

Maturação molecular

Para atingir a competência para o seu completo desenvolvimento, o oócito precisa passar gradualmente por mudanças que incluem um remodelamento físico e molecular (FAIR et al., 1996). A transição do controle genômico materno-embriônico em bovinos ocorre tardiamente; quando o embrião apresenta quatro células (MEMILI & FIRST, 2000). Portanto, o oócito é o principal responsável por coordenar os ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) e as proteínas que foram acumuladas durante a sua fase de crescimento (FAIR et al., 2007; HAMATANI, et al., 2008). O perfil transcricional de oócitos bovinos maturados *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado vias distintas e variações no número de genes, o que pode alterar o desenvolvimento embrionário após a fertilização (KATZ-JAFFE et al., 2009; MAMO et al., 2011).

A análise do transcriptoma oocitário durante a maturação usando técnicas de análise de mRNA globais fornece um recurso que pode ser ampliado e explorado continuamente por novos programas e técnicas de sequenciamento para identificar genes envolvidos com o processo de maturação nuclear e citoplasmática, e dos locais de controle específicos que regulam a aquisição da completa competência oocitária (ASSOU et al., 2006).

MAMO et al. (2011) estabeleceram as mudanças globais do perfil transcriptômico que ocorrem durante a maturação meiótica de oócitos bovinos imaturos e após a maturação *in vitro*. Foi identificado um grande número de diferentes genes, dos quais aproximadamente 75% foram mais expressos em oócitos imaturos, reforçando a ideia de que a maioria dos transcritos é acumulada quando os oócitos se encontram no estágio de vesícula germinativa. Estes transcritos irão coordenar o subsequente desenvolvimento oocitário até a ativação do genoma embrionário.

Maturação *in vitro*

Para entender a regulação local da maturação oocitária e os fatores endócrinos envolvidos neste processo, sistemas de cultivo *in vitro* são frequentemente utilizados (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A adição de substâncias promotoras de crescimento ao meio de maturação e a tentativa de

simular da forma mais fidedigna possível as condições intrafoliculares, tem sido os dois principais alvos das pesquisas realizadas com o objetivo de aumentar a eficiência do desenvolvimento de oócitos cultivados *in vitro*. Durante o cultivo *in vitro*, os nutrientes, a atmosfera, osmolaridade e o pH devem ser cuidadosamente controlados, tentando mimetizar o máximo possível o ambiente folicular *in vivo* (GOTTARDI & MINGOTI, 2009).

O meio de cultivo mais utilizado para a maturação de oócitos bovinos *in vitro* é o meio de cultivo de tecidos 199 (TCM199), apesar de não ser um meio específico capaz de suprir as complexas necessidades dinâmicas dos complexos cúmulo-oócito durante a MIV. Este fato tem levado vários pesquisadores a realizarem várias investigações para melhorar este meio e, conseqüentemente, a qualidade dos oócitos cultivados em sistemas *in vitro* (GORDON, 1994; GOTTARDI & MINGOTI, 2009).

O soro e a albumina sérica bovinas são as fontes de proteínas mais utilizadas como suplemento aos meios de cultivo de bovinos (MINGOTI et al., 2002), porém vários estudos demonstraram que há desvantagens ao se utilizar fontes de origem animal nos meios de produção *in vitro*, uma vez que eles podem ser veículos de agentes infecciosos e tóxicos para o embrião (GARDNER, 1994; THOMPSON et al., 1995). Em virtude disso, vários estudos recomendam a utilização de meios quimicamente definidos, apesar de estes proporcionarem baixas taxas de blastocistos viáveis (ALI & SIRARD, 2002; THOMAS et al., 2003; KORKONE et al., 2008).

Uma melhora da expansão das células do cúmulo é observada quando os hormônios LH e FSH são adicionados aos meios de maturação (YOUNIS & BRACKETT, 1992). A produção de substâncias sinalizadoras pelas células somáticas é estimulada pelo FSH. Estas substâncias induzem à retomada da meiose, estimulam a expansão do cúmulo e, por fim, facilitam a fertilização (GOTTARDI & MINGOTI, 2009).

A produção de blastocistos é influenciada pelo pH das soluções do fluido celular, o qual é crítico para a eficiência de vários eventos e reações bioquímicas que envolvem equilíbrio ácido-básico, podendo afetar a viabilidade celular. A utilização de tampões no meio de cultivo é necessária para reduzir as variações do pH no meio, que deve permanecer entre 7,3 e 7,5 durante a maturação dos oócitos e cultivo dos embriões. A MIV é, geralmente, realizada em uma atmosfera de 5% CO₂, sendo utilizado meio tamponado com bicarbonato de sódio para a manutenção do pH em 7,4. Quando a maturação é realizada em ar atmosférico, o meio ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxietil)piperazina-1(HEPES) mantém o pH do meio de maneira mais eficiente em relação à utilização única de bicarbonato, sendo o sistema tampão orgânico mais utilizado para o cultivo de tecidos e células animais (GOTTARDI & MINGOTI, 2009). Em contrapartida, estudos mostraram que o HEPES pode reduzir o pH intracelular ou causar alteração no desenvolvimento da competência oocitária, além de poder ser tóxico e causar fragmentação celular durante as primeiras divisões embrionárias (IWASAKI et al., 1999; HASHIMOTO et al., 2003; MORGIA et al., 2006).

A suplementação dos meios de maturação com fatores de crescimento tem sido indicada, como o fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), o Kit ligante (KL), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), as BMPs, dentre vários outros. Todos estes fatores estão ligados ao crescimento celular, desenvolvimento de mensageiros bioquímicos

e aos receptores que se completam para a aquisição da competência oocitária final, visando à melhora da produção *in vitro* de embriões (GOTTARDI & MINGOTI, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos estágios iniciais do desenvolvimento oocitário e folicular *in vivo* é importante para um melhor entendimento das vias moleculares que regulam a oogênese, a foliculogênese e a maturação oocitária. Desta forma, os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na maturação poderão contribuir com o aumento na eficiência da produção de embriões *in vitro*.

Apesar de a maturação oocitária envolver inúmeros processos, dos quais muitos ainda não foram totalmente elucidados, sabe-se que vários fatores de crescimento e a relação oócito-células do cúmulo é crucial para a regulação da maturação e retomada da meiose, conferindo ao oócito competência necessária para o seu correto desenvolvimento.

Devido à grande maioria dos folículos ovarianos entrarem em atresia, levando à perda de um grande número de oócitos, torna-se necessário o melhor entendimento dos processos que estão relacionados à ativação folicular e retomada da meiose, para a obtenção de um maior número de oócitos que serão destinados à produção *in vitro* de embriões, visando ao aumento da produção de animais de produção ou preservação daqueles em vias de extinção.

REFERÊNCIAS

AERTS, J. M., BOLS, P. E.; Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.171-179, 2010.

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.

ARLOTTO, T., SCHWARTZ, J. L., FIRST, N. L., LEIBFRIED, M. L.; Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.943-956, 1996.

ARMSTRONG, D. T.; Effect of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1303-1322, 2001.

ASSOU, S., ANAHORY, T., PANTESCO, V., LE CARROUR, T., PELLESTOR, F., KLEIN, B., REYFTMANN, L., DECHAUD, H., DE VOS, J., HAMAMAH, S.; The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. **Human Reproduction**, v.21, n.7, p.1705-1719, 2006.

BLANCO, M. R., DEMYDA, S., MORENO MILLÁN, M., GENERO, E.; Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.7, p.155-165, 2011.

BORNSLAEGER, E. A., MATTEI, P. M., SCHULTZ, R. M.; Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. **Developmental Biology**, v.114, p.453-462, 1986.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S.; Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.

BREVINI, T. L., CILLO, F., ANTONINI, A., GANDOLFI, F.; Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.23-38, 2007.

BREVINI-GANDOLFI, T., GANDOLFI, F.; The maternal legacy to the embryo: Cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255–1276, 2001.

CARABATSOS, M. J., SELBITTO, C., GOODENOUGH, D. A., ALBERTINI, D. F.; Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Developmental Biology**, v.226, p.167–79, 2000.

CARRELL, D. T., LIU, L., HUANG, I., PETERSON, M.; Comparison of maturation, meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two protocols for *in vitro* culture of mouse secondary follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.22, p.347-354, 2005.

CONTI, M., ANDERSEN, C. B., RICHARD, F. J., SHITSUKAWA, K., TSAFRIRI, A.; Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.9–14, 1998.

CORTVRINDT, R., HU, Y., SMITZ, J.; Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiating factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulated hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. **Human Reproduction**, v.13, p.1292-1303, 1998.

DRIANCOURT, M. A., REYNAUD, K., CORTVRINDT, R., SMITZ, J.; Roles of kit and kit ligand in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.143-152, 2000.

DURLINGER, A. L. L., VISSER, J. A., THEMME, A. P. N.; Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. **Reproduction**, v.124, p.601-609, 2002.

EDDY, E. M., CLARK, J. M., GONG, D., FENDERSON, B. A.; Origin and migration of primordial germ cells in mammals. **Gamete Research**, v.4, p.333-362, 1981.

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

FAIR, T., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M.; Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, n.4, p.503-512, 1996.

FAIR, T., CARTER, F., PARK, S., EVANS, A. C., LONERGAN, P.; Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.68, n.1, p.91-97, 2007.

FLEISCHMAN, R. A.; From white spots to stem cells: the role of the kit receptor in mammalian development. **Trends in Genetics**, v.9, p.285-290, 1993.

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.

FREEMAN, B.; The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. **Reproduction**, v.125, p.635-643, 2003.

GARDNER, D. K.; Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell Biology international**, v.18, p.1163-1179, 1994.

GINSBURG, M., SNOW, M. H., MCLAREN, A.; Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v.110, p.521-528, 1990.

GORDO, A. C., HE, C. L., SMITH, S., FISSORE, R. A.; Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.106-114, 2001.

GORDON, I.; **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CABI International, 1994, 640p.

GOTTARDI, F. P., MINGOTI, G. Z.; Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

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.

HAMATANI, T., YAMADA, M., AKUTSU, H., KUJI, N., MOCHIMARU, Y., TAKANO, M., TOYODA, M., MIYADO, K., UMEZAWA, A., YOSHIMURA, Y.; What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? **Reproduction**, v.135, n.5, p.581-592, 2008.

HASHIMOTO N, WATANABE N, FURUTA Y, TAMEMOTO H, SAGATA N, YOKOYAMA M, OKASAKI, K., NAGAYOSHI, M., TAKEDAT, N., IKAWATLL, Y., AIZAWAI, S.; Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. **Nature**, v.370, p.68-71, 1994.

HASHIMOTO, S., MINAMI, N., TAKAKURA, R., IMAI, H.; Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1696-1701, 2003.

HOMA, S. T.; Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, p.122-134, 1995.

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

IWASAKI, T., KIMURA, E., TOTSUKAWA, K.; Studies on a chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.709-720, 1999.

KATZ-JAFFE, M. G., MCCALLIE, B. R., PREIS, K. A., FILIPOVITS, J., GARDNER, D. K.; Transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v.71, n.6, p.939-946, 2009.

KOL, S., ADASHI, E. Y.; Intraovarian factors regulating ovarian function. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.7, p.209-213, 1995.

KOOPMAN, P., GUBBAY, J., VIVIAN, N., GOODFELLOW, P., LOVELL – BADGE R.; Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature**, v.351, p.117–121, 1991.

KORKONE, K., KANANEN, K., KETOJA, E., MATOMA, J., HALMEKYTO M, PEIPPO J.; Effects of serum-free *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. **Reproduction of Domestic Animals**, v.45, p.42-49, 2008.

KRISHER, R. L.; The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v.82, p.14-23, 2004.

LI, S., MARUO, T., LADINES-LLAVE, C. A., KONDO, H., MOCHIZUKI, M.; Stage-limited expression of myc oncoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. **Journal of Endocrinology**, v.41, p.83-92, 1994.

MAMO, S., CARTER, F., LONERGAN, P., LEAL, C. L. V., NAIB, A. A., MCGETTIGAN, P., MEHTA, J. P., EVANS, A. C. O., FAIR, T.; Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, n.151, p.1-14, 2011.

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.

MATZUK, M. M., BURNS, K. H., VIVEIROS, M. M., EPPIG, J. J.; Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296, p.2178–2190, 2002.

MEMILI, E., FIRST, N. L.; Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v.8, n.1, p.87-96, 2000.

MINGOTI, G. Z., GARCIA, J. M., ROSA E SILVA, A. A. M.; Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.175-186, 2002.

MONIRUZZAMAN, M., MIYANO, T.; Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.559-566, 2010.

MORGIA, F. M., TORTI, M., MONTIGIANI, M., PISCITELLI, C., GIALONARDO, M., SCHIMBERNI, M., GIANNINI, P., SBRACIA, M.; Use of a medium buffered with N-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonate (HEPES) in intracytoplasmic sperm injection procedures is detrimental to the outcome of *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1415-1419, 2006.

OKTEM, O., OKTAY, K.; Stem cells: a perspective on oocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1127, p.20-26, 2008.

PENG, X. R., HSUEH, A. J., LAPOLT, P. S., BJERSING, L. N. Y. T.; Localization of luteinizing hormone receptor Messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v.129, p.3200-3207, 1991.

PEPLING, M. E.; From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis**, v.44, 622-632, 2006.

PICTON, H., BRIGGS, D., GOSDEN, R.; The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998.

SÁNCHEZ, F., SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.1896-1912, 2012.

SAWYER, H. T., SMITH, P., HEATH, D. A., JUENGEL, J. L., WAKEFIELD, S. J., MCNATTY, K. P.; Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1134-1150, 2002.

SIRARD, M. A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C.; Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

SMITZ, J. E., CORTVRINDT, R. G.; The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002.

SOYAL, S. M., AMLEH, A., DEAN, J.; Fig α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. **Development**, v.127, p.4645-4655, 2000.

STOJKOVIC, M., MACHADO, A., SOTOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONÇALVES, P. B., WOLF, E.; Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation, correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

STEUERWALD, N., BARRITT, J. A., ADLER, R., MALTER, H., SCHIMMEL, T., COHEN, J., BRENNER, C. A.; Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. **Zygote**, v.9, p.209-215, 2000.

SUN, Q. Y., SCHATTEN, H.; Regulation of dynamic events by microfilaments during maturation and fertilization. **Reproduction**, v.131, p.193-203, 2006.

THOMAS, H. F., WALTERS, A. K., TELFER, E. E.; How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. **Human Reproduction Update**, v.9, p.541-555, 2003.

THOMPSON, J. G., GARDNER, D. K., PUGH, P. A., MCMILLAN, W. H., TERVIT, H. R.; Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.53, p.1385-1391, 1995.

TINGEN, C., KIM, A., WOODRUFF, T. K.; The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v.15, p.795-803, 2009.

TROUNSON, A., ANDERIESZ, C., JONES, G.; Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v.121, p.51-75, 2001.

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.

VAN DEN HURK, R., BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J.; In: JOY, K. P., KRISHNA, A., HALDAR, C.; **Comparative endocrinology and reproduction**. New Delhi, Narosa Publishing House, p. 296-312, 1999.

VAN DEN HURK, R., ABIR, R., TELFER, E. E., BEVERS, M. M.; Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v.6, p.457-74, 2000.

VAN DEN HURK, R., ZHAO, J.; Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

WATSON, A. J.; Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, p.E1-E3, 2007.

WESSEL, G. M., BROOKS, J. M., GREEN, E., HALEY, S., VORONINA, E., WONG, J., ZAYDFUDIM, V., CONNER, S.; The biology of Cortical Granules. **International Review of Cytology**, v.209, p.117-206, 2001.

WILDING, M., DALE, B., MARINO, M., DI MATTEO, L., ALVIGGI, C., PISATURO, M. L., LOMBARDI, L., DE PLACIDO, G.; Mitochondrial aggregation patterns and activity

in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v.16, p.909-917, 2001.

YANG, M. Y., FORTUNE, J. E.; The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v.78, p.1153-1161, 2008.

YING, Y., QI, X., ZHAO, G-Q.; Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.14, p.7858-7862, 2001.

YOUNIS, A. I., BRACKETT, B. G.; Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.2, p.44-51, 1992

ZHAO, J., TAVERNE, M. A., VAN DER WEIJDEN, G. C., BEVERS, M. M., VAN DEN HURK, R.; Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v.65, p.967-977, 2001.