

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 17/08/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PRÉ-MATURAÇÃO IN VITRO DE
OÓCITOS BOVINOS COM NPPC E VESÍCULAS
EXTRACELULARES OBTIDAS EM DIFERENTES
FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR**

Giovana Barros Nunes

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

PRÉ-MATURAÇÃO IN VITRO DE
OÓCITOS BOVINOS COM NPPC E VESÍCULAS EXTRACELULARES OBTIDAS
EM DIFERENTES FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

Giovana Barros Nunes
Orientadora: Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área Reprodução Animal.

N972p Nunes, Giovana Barros
Pré-maturação in vitro de oócitos bovinos com NPPC e vesículas extracelulares obtidas em diferentes fases da onda de crescimento folicular / Giovana Barros Nunes. -- Jaboticabal, 2022
67 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti

1. Maturação in vitro de oócitos. 2. Bovino. 3. Reprodução. 4. Tecnologias reprodutivas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS COM NPPC E VESÍCULAS EXTRACELULARES OBTIDAS EM DIFERENTES FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

AUTORA: GIOVANA BARROS NUNES

ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Gisele Zoccal Mingoti

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / FMVA UNESP Aracatuba/SP

p/ Gisele Zoccal Mingoti

Prof. Dr. JULIANO COELHO DA SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária-FZEA / Pirassununga/SP

p/ Gisele Zoccal Mingoti

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

p/ Gisele Zoccal Mingoti

Prof. Dr. JOAO CARLOS PINHEIRO FERREIRA (Participação Virtual)
Depto de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ - Unesp - Botucatu

p/ Gisele Zoccal Mingoti

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Giovana Barros Nunes – nascida em Presidente Prudente-SP, aos 30 dias do mês de novembro de 1992. Concluiu o ensino médio no Colégio Criativo/Objetivo, na cidade de Rancharia-SP, em dezembro de 2010. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Câmpus de Araçatuba-SP, em março de 2011. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2015. cursou Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Câmpus de Jaboticabal-SP, de março de 2016 a março de 2018, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa da CAPES. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Doutorado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Câmpus de Jaboticabal-SP, em março de 2018, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa da CAPES.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adalberto e Elza, por todo apoio e amor incondicional. Ao meu irmão, Felipe, por se orgulhar e trilhar comigo o sonho da docência. Ao meu marido, Márcio, por todo amor, apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por me ampararem sempre no amor.

À Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, pela orientação, confiança e ensinamentos. Obrigada por ser inspiração para me permitir trilhar o caminho da pesquisa e docência.

Aos meus pais, José Adalberto Nunes e Elza M. C B. Nunes, por me apoiarem incondicionalmente durante toda a minha trajetória para chegar até aqui. Por todo amor e esforços a mim dedicados. Minha eterna gratidão.

Ao meu irmão, Felipe G. B. Nunes, por sempre estar ao meu lado, se orgulhar e comemorar minhas conquistas junto comigo.

A todos os meus familiares e amigos, pelo apoio e por se orgulharem das minhas conquistas.

Ao meu marido, Márcio Martins, por todo apoio, incentivo e amor incondicional. Além da paciência para aceitar a loucura da minha rotina de experimentos.

As minhas amigas de profissão e laboratório Beatriz C. S. Leão, Nathália S. S. Rocha-Frigoni e Priscila Chediek Dall'Acqua, por todos os ensinamentos compartilhados e apoio incondicional.

A Cíntia Rodrigues da Silva, amiga de profissão/laboratório e de vida, pela amizade e apoio nesta reta final. Obrigada por sempre lembrar meus compromissos quando eu esquecia.

A Flávia Regina Florencio de Athayde, a famosa Flavinha, pela amizade construída durante a pós-graduação e por toda ajuda, imensurável, com diversas análises. Serei eternamente grata.

Ao técnico do laboratório, Alexandre Texeira, pelo companheirismo, apoio e cuidados incondicionais para comigo. Além do auxílio necessário para a realização dos experimentos e funcionamento do laboratório.

Ao funcionário Adão Custódio por providenciar o material necessário para a realização dos experimentos.

Aos professores componentes da banca examinadora, Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira, Profa. Dra. Lindsay Unno Gimines, Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira e ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelos ensinamentos e contribuições na defesa.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal – LMMC, Fapesp 2004/08868-0 Coordenadora: Prof^ª. Dr^ª. Munira Muhammad Abdel Baqui Especialista do laboratório: Elizabete Rosa Milani.

Ao Laboratório do Professor Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp-Botucatu. Fapesp 2012/18297-7, e 2014/21257-2.

As minhas amigas, Bruna Bittar, Vivian Senteio e Jaqueline Senteio, pela amizade de longa data e por me apoiarem incondicionalmente mesmo de longe.

As minhas amigas, Laís Tubone, Raphaela Araújo e Mayara Ribeiro, pela amizade iniciada na graduação e que se perdura até hoje.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, e ao Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única pela oportunidade de realizar o Doutorado.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP por ter permitido a minha formação profissional. E por permite o uso das instalações do Departamento de Produção e Saúde Animal para a realização dos experimentos.

À toda equipe do nosso tão querido Laboratório de Fisiologia da Reprodução (#labfisiorep), por terem contribuído de alguma forma com esse trabalho e com o meu crescimento profissional e pessoal.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS COM NPPC E VESÍCULAS EXTRACELULARES OBTIDAS EM DIFERENTES FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

RESUMO – Oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* (MIV) retomam espontaneamente a maturação nuclear, no entanto, este padrão não é observado em relação às maturações citoplasmática e molecular. Desta forma, tais oócitos constituem uma população heterogênea em relação aos eventos que compõem a maturação oocitária para aquisição de competência. Este estudo propôs avaliar os efeitos de um sistema de pré-maturação *in vitro* (préMIV) de complexos cumulus oócitos (CCOs) bovinos com o uso do bloqueador precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) e com vesículas extracelulares (VEs) obtidas de folículos em diferentes fases do desenvolvimento [pré-desvio ~ 7 mm (PreDev); desvio ~8,5 mm (DevF1); pós-desvio ~12 mm (PostDev) e; pré-ovulatório > 12 mm (PreOv)], sobre: (1) a captação das VEs pelas células dos CCOs; (2) a transferência de RNA das VEs para os oócitos; (3) o padrão de compactação da cromatina e aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento embrionário e; (4) parâmetros de qualidade dos embriões provenientes deste sistema. Ao final do período de 8 horas do sistema de préMIV foi possível evidenciar, em todos os grupos tratados com VEs (PreDev, DevF1, PostDev e PreOv), a captura das mesmas pelas células dos CCOs, bem como a transferência de RNA proveniente destas vesículas para o ooplasma, sendo que os oócitos do grupo DevF1 apresentaram concentração de RNA aumentada no ooplasma, quando comparados aos oócitos dos demais grupos ($P < 0.05$). Em relação ao padrão de compactação da cromatina (vesícula germinativa – VG – de 0 a 3) dos CCOs, independente do grupo avaliado (Imaturo – imediatamente após a remoção do folículo ovariano, Controle – meio de préMIV sem adição de VEs, PreDev, DevF1, PostDev e PreOv), não houve diferença ($P > 0.05$) quanto às categorias VG0 e VG2; já as categorias de VG1e VG3 diferiram entre os grupos ($P < 0.05$), sendo que o grupo Imaturo apresentou maior taxa de oócitos em VG1 (61,9%), em relação a todos os grupos, e menor taxa de oócitos em VG3 (5,7%) quando comparado aos grupos PreDev (45,4) e PostDev (48,1%) ($P < 0.05$). O cultivo de préMIV associado ou não às VEs não promoveu aumento das taxas de clivagem (Controle 82%, PreDev 81,5%, DevF1 75%, PostDev 76% e PreOv 76,9%) ($P > 0.05$) e desenvolvimento embrionário (Controle 43,6%, PreDev 38,6%, DevF1 48,1%, PostDev 38,3% e PreOv 40,4%) ($P > 0.05$). Em relação aos parâmetros de qualidade embrionária, o grupo PostDev apresentou maior número de blastômeros em relação ao grupo Controle ($P < 0.05$), porém as avaliações de potencial de membrana mitocondrial e porcentagem de células apoptóticas não diferiram, independente do tratamento ($P > 0.05$). Concluímos, portanto, através dos achados na literatura, que o trabalho aqui apresentado é o primeiro a utilizar um sistema de pré-maturação *in vitro* de complexos cumulus oócitos bovinos enriquecido com vesículas extracelulares e, evidenciamos, a partir dos resultados que o sistema permitiu a interação entre as células do complexo cumulus oócitos e vesículas extracelulares, independente da fase do desenvolvimento folicular

em que as vesículas foram obtidas. Adicionalmente, foi possível evidenciar melhorias na qualidade dos embriões sugerindo efeitos benéficos deste sistema.

Palavras-chave: pré-maturação, bloqueio meiótico, competência oocitária, produção *in vitro* de embriões, qualidade embrionária

In vitro prematuration of bovine oocytes with NPPC and extracellular vesicles from different follicles stages

Abstract – Oocytes that undergo in vitro maturation (IVM) spontaneously resume nuclear maturation, however, this pattern is not observed in cytoplasmic and molecular maturation. This situation creates a heterogeneous oocyte population which influences the developmental competence acquisition. For this reason, the present study proposed to evaluate the effects of an in vitro prematuration (preIVM) system of bovine cumulus oocyte complex (COC) with C-type natriuretic peptide precursor (NPPC) and extracellular vesicles (EVs) from follicles at different stages of development [pre-deviation ~ 7 mm (PreDev); deviation ~ 8,5 mm (DevF1); post-deviation ~ 12 mm (PostDev) and; pre-ovulatory > 12 mm (PreOv)], on: (1) uptake of EVs by COC cells; (2) RNA transfer from EVs to oocytes; (3) COC chromatin configuration and developmental competence acquisition; (4) embryos quality parameters. After 8 hours of preIVM, it was possible to evidence, in all groups treated with EVs (PreDev, DevF1, PostDev and PreOv), their capture by COCs, as well as, the transfer of RNA from these vesicles to the ooplasm. The DevF1 group was the only group, when compared to the other groups, that showed an increase in the cytoplasmic RNA concentration ($P < 0.05$). The assessment of COC chromatin configuration (germinal vesicle – GV – 0 to 3), regardless of the group (Immature – after follicle immediately removal, Control – preIVM medium without EVs, PreDev, DevF1, PostDev and PreOv) no difference ($P > 0.05$) was noted for GV0 and GV2 categories. Whereas the GV1 and GV3 categories differed between groups ($P > 0.05$), the group with the highest percentage of oocytes in GV1 was the Immature group (61.9%), this group also had a lower rate of oocytes in GV3 (5.7%) when compared to the PreDev (45.4%) and PostDev (48.1%) groups ($P < 0.05$). The preIVM culture, with or without EVs, did not promote an increase in cleavage rates (D3) (Control 82%, PreDev 81.5%, DevF1 75%, PostDev 76% and PreOv 76.9%) ($P > 0.05$) and embryonic development rates (D7) (Control 43.6%, PreDev 38.6%, DevF1 48.1%, PostDev 38.3% and PreOv 40.4%) ($P > 0.05$). Embryos from PostDev group had more blastomere numbers than the control group ($P < 0.05$). However, the assessments of mitochondrial membrane potential and apoptotic cells did not differ independent of treatment ($P < 0.05$). In conclusion, this is the first study in the literature to use an in vitro pre-maturation system of bovine cumulus oocyte complex enriched with extracellular vesicles and through the results presented here we confirm that the in vitro pre-maturation system of bovine cumulus oocyte complex allowed the interaction between the cumulus cells and extracellular vesicles regardless of the stage of follicular development in which the vesicles were obtained. Additionally, it was possible to evidence improvements in the quality of the embryos suggesting beneficial effects of this system.

Keywords: prematuration culture, meiotic block, oocyte competence, in vitro embryo production, embryonic quality.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de embriões *in vitro* do mundo, de acordo com dados divulgados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (da sigla em inglês, IETS), desde 2019, mais de 70% dos embriões produzidos e transferidos no mundo são de origem *in vitro*. No entanto, apesar das biotecnologias da reprodução, como a produção *in vitro* de embriões, serem ferramentas valiosas para aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas bovinas em um curto período, muitos entraves ainda limitam a eficiência destas técnicas, como por exemplo: (1) a origem e qualidade dos complexos cumulus oócitos (CCO) submetidos à maturação *in vitro* (MIV), ou seja, condições fisiológicas e genéticas das fêmeas doadoras dos gametas; (2) redução da qualidade espermática no ambiente *in vitro*, o que reflete negativamente nas taxas de fertilização *in vitro* (FIV) e; (3) condições de cultivo *in vitro* (CIV) que afetam a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (PIV). Todas essas limitações resultam em taxas de desenvolvimento embrionário e taxas de prenhez, após transferência embrionária (TE), reduzidas, quando comparadas às taxas de desenvolvimento e prenhez dos embriões produzidos *in vivo* (Ferré et al., 2020; Rizos et al., 2002; Cavalcanti et al., 2018; Lonergan e Fair, 2016).

Atualmente, 90% dos oócitos imaturos recuperados para a MIV são capazes de completar o evento da maturação nuclear e atingir o estágio de metáfase II (MII), destes aproximadamente 80% são fertilizados e somente 20 a 40% se desenvolvem até o estágio de blastocisto (Lonergan e Fair, 2016). Apesar de quase a maior parte dos CCO completarem a maturação nuclear (condição na qual o gameta é ovulado *in vivo*), diversos estudos apontam que as baixas taxas de desenvolvimento embrionário estão intimamente relacionadas a qualidade dos oócitos e não, somente, aos eventos pós-fertilização como os números parecem apontar (Lonergan e Fair, 2016). De acordo com Rizos et al. (2002), a qualidade oocitária é a responsável pelo sucesso do desenvolvimento embrionário *in vitro*, enquanto as condições de cultivo são responsáveis pela qualidade do embrião.

Portanto, compreender o evento da maturação oocitária é imprescindível para melhorar as condições do sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos, visando aumentar a taxa de desenvolvimento embrionário.

A maturação oocitária, que se inicia durante a vida fetal da fêmea, consiste em um evento complexo e gradual, no qual o oócito cresce e se desenvolve, em associação com o desenvolvimento e crescimento folicular. Essa interação entre oócito e folículo (células foliculares) é essencial para que a competência oocitária seja adquirida, permitindo o desenvolvimento embrionário inicial (Lodde et al., 2013).

O folículo consiste em um ambiente inibitório que mantém a configuração nuclear dos oócitos em diplóteno da prófase da meiose I (PI), fase caracterizada e chamada de vesícula germinativa (VG – presença do envelope nuclear). Durante esta fase, conforme o oócito cresce, a cromatina assume progressivo padrão de condensação e a avaliação *in vitro* de oócitos em VG, evidenciou padrões de 0 (cromatina totalmente descondensada) a 3 (cromatina totalmente condensada) (Lodde et al., 2007). Os padrões de condensação da cromatina estão intimamente ligados à atividade transcricional do oócito, a qual é fundamental para o armazenamento de ácido ribonucleico mensageiro (da sigla em inglês, mRNA) e proteínas necessárias para a sobrevivência do embrião até a ativação do seu genoma. Por tanto, oócitos em grau 0 (VG0) possuem intensa atividade transcricional, ao passo que oócitos em grau 1 (VG1) têm a atividade reduzida e quando atingem os graus 2 e 3 de condensação (VG2 e VG3, respectivamente) essa atividade é completamente interrompida (silenciamento transcricional) (Lodde et al., 2007; Lodde et al., 2008).

Com o estímulo gonadotrófico para a ovulação, oócitos em VG passam pelo evento de quebra da vesícula germinativa (QVG) e progridem para metáfase II, logo, do ponto de vista nuclear, oócitos em MII são considerados maduros. Além disso, modificações citoplasmáticas e moleculares ocorrem em sincronia e contribuem para a completa maturação oocitária, tornando o oócito competente para o desenvolvimento embrionário (Roelen, 2020).

A recuperação de oócitos para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) deve ser feita a partir de folículos antrais médios, os quais apresentam diâmetro entre 3 a 8mm. De acordo com a literatura, o diâmetro folicular é considerado preditor da qualidade oocitária (Blondin e Sirard, 1995), ou seja, folículos menores do que 2mm (0,5 a 2 mm) apresentam quase que a totalidade de seus oócitos com padrão de VG0 e poucos em VG1, ao passo que folículos com diâmetro igual ou maior do que 2 mm apresentam distribuição homogênea de oócitos em VG1, VG2 e VG3 (Dieci et al., 2016). A relação entre o diâmetro folicular e o grau de compactação da cromatina deve ser levado em consideração no momento da recuperação dos CCO, pois o padrão de VG0 confere ao oócito a classificação de não competente para continuar o desenvolvimento no ambiente *in vitro*, bem como não competente para o desenvolvimento embrionário. Ao passo que as demais categorias de compactação da cromatina, conferem aos oócitos competência para continuarem o desenvolvimento no ambiente *in vitro* e para o desenvolvimento embrionário inicial (Luciano et al., 2014). Contudo folículos com diâmetro acima de 8mm, em bovinos, já se encontram próximo a fase de dominância folicular e, portanto, podem envelhecer no ambiente *in vitro* ou estarem em processo de atresia, reduzindo as taxas de desenvolvimento embrionário (Labrecque et al., 2016).

Apesar de todas as classificações para a escolha dos folículos e conseqüentemente dos oócitos de melhor qualidade, quando o CCO é removido do ambiente folicular a comunicação entre as células foliculares, células do cumulus e oócito é perdida, favorecendo a retomada espontânea da meiose. Desta forma, o oócito que antes encontrava-se em diferentes graus de VG, progride rapidamente para MII e as demais modificações que compreendem todo o processo de aquisição de competência oocitária são interrompidas (Downs, 1993).

O sistema de cultivo de pré-maturação *in vitro* (pré-MIV) foi criado para impedir a interrupção inadequada das comunicações entre as células que compreendem o CCO e a retomada espontânea da divisão meiótica, fornecendo, portanto, tempo e ambiente favorável para que os eventos da maturação oocitária ocorram em sincronia. Com o uso deste sistema, Diece

et al. (2016), a partir de oócitos bovinos, aumentaram a taxa de desenvolvimento embrionário se comparada a taxa obtida com um protocolo padrão de PIVE (40% vs 20%). Este sistema consiste na utilização de um ou mais agentes, naturais ou sintéticos, que bloqueiam de forma temporária e reversível a divisão meiótica no oócito.

O peptídeo natriurético tipo C se destaca entre as drogas utilizadas nos sistemas de pré-MIV, por fazer parte naturalmente do controle da maturação oocitária e ter efeito reversível. Em oócitos de camundongos o uso no NPPC resulta em 80-100% de bloqueio meiótico (Richard, Baltz, 2014) e em bovinos o bloqueio se mostra entre 80-90% (Franciosi et al., 2014; Zhang et al., 2017). Ainda em bovinos é possível observar a manutenção da funcionalidade das junções gap, aumento na taxa de desenvolvimento embrionário (51,6% vs. 32% da MIV convencional) (Zhang et al., 2017), aumento no número de embriões eclodidos e no número de blastômeros, sendo estes dois últimos indicadores de qualidade embrionária (Franciosi et al., 2014).

Outra alternativa para melhorar a qualidade oocitária e embrionária que tem sido objeto de estudo na área da PIVE bovinos é a adição de vesículas extracelulares aos meios de cultivo. As vesículas extracelulares representam um mecanismo de comunicação intercelular e já foram descritas como marcadores biológicos, além de vetores para fármacos, no tratamento de doenças, devido a sua similaridade com a membrana celular (Edgar, 2016). Atualmente são conhecidas por apresentarem diâmetro inferior a 200 nm e carregarem lipídeos, proteínas, RNAm, micro RNA (miRNA) e DNA (Keller et al., 2006). As vesículas extracelulares já foram isoladas do fluido folicular de fêmeas bovinas e estudos comprovaram a participação destas pequenas vesículas nos eventos de oogênese, foliculogênese, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (Hung et al., 2015; da Silveira et al., 2017; Boyer et al., 2010). Além do mais, o isolamento das vesículas extracelulares do fluido folicular de vacas, a partir de folículos em diferentes momentos da onda de crescimento folicular, evidenciou diferença na constituição destas vesículas (revisado por Hung et

al., 2015), sugerindo que as mesmase adaptam de acordo com o microambiente em que se encontram.

Diante da heterogeneidade da população de complexos cumulus oócitos que é direcionada para a produção *in vitro* de embriões bovinos e esclarecido um dos possíveis fatores que prejudicam a aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento embrionário, a hipótese do presente trabalho consiste que o uso do sistema de pré-maturação *in vitro*, por 8 horas, de complexos cumulus oócitos bovinos, contendo NPPC e vesículas extracelulares é capaz de bloquear temporariamente a meiose permitindo com que o oócito adquira competência e se desenvolva até o estágio de blastocisto expandido *in vitro*. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a interação, bem como os efeitos das vesículas extracelulares (provenientes de diferentes fases do desenvolvimento folicular) e do bloqueador da meiose (NPPC) sobre a configuração da cromatina oocitária, aquisição de competência para o desenvolvimento e qualidade dos embriões provenientes deste sistema.

6 Conclusão

Conclui-se, portanto, que este é o primeiro trabalho a associar vesículas extracelulares, obtidas de folículos em diferentes momentos do desenvolvimento, em sistema de pré-maturação *in vitro* de complexos cumulus oócitos bovinos. Independente da fase do desenvolvimento folicular em que as vesículas extracelulares foram isoladas, a partir dos achados em nosso trabalho foi possível evidenciar a captação das vesículas pelas células do complexo cumulus oócito.

Embora, esta associação não tenha refletido em aumento nas taxas de produção *in vitro* de embriões, melhorias em padrões de qualidade embrionária, como o número de blastômeros e ausência de efeitos deletérios à produção embrionária (estresse oxidativo e apoptose) foram evidenciados. Adicionalmente foi possível evidenciar a liberação de RNA proveniente das vesículas extracelulares no citoplasma dos oócitos bovinos, o que nos sugere que estes componentes podem ter papel durante o processo de aquisição de competência para o desenvolvimento.

7 REFERÊNCIAS

Adona PR, Leal CLV (2004) Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote** 12:197-204.

Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB (2010) Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction** 25:2999-3011.

Anderson E, Albertini DF (1976) Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **The Journal of Cell Biology** 71:680-686.

Bilodeau-Goeseels S (2003) Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocyte. **Theriogenology** 60:1679-1690.

Bilodeau-Goeseels S (2012) Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its values to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals** 47:687-693.

Blondin P, Sirard M-A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development** 41:54-62.

Boyer A, Goff AK, Boerboom D (2010) WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism** 21:25-32.

Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF (2000) Oocyte-Granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Developmental Biology** 226:167-179.

Cavalcanti CM, Campelo IS, Silva MMAS, Albuquerque VS, Melo LM, Freitas JF (2018) Efficiency of different incubation systems for the *in vitro* production of bovine embryos. **Zygote** 26:324-318.

Cavalcanti CM, Campelo IS, Silva MMAS, Albuquerque VS, Melo LM, Freitas JF (2018) Efficiency of different incubation systems for the *in vitro* production of bovine embryos. **Zygote** 26:324-318.

Conti M, Andersen CB, Richard FJ, Shitsukawa K, Tsafiri A (1998) Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology** 145:9-14.

Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun S-Y, Horner K, Jin C, Tsafiri A (2002) Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology** 187:153-159.

Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS (2012) Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology** 356:65-73.

Coulmans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, et al. (2017) Methodological guidelines to study extracellular vesicles. **Circulation Research** 12:1632-1648.

da Silveira JC, Rao Veeramachaneni DN, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ (2012) Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction** 86:1-10.

da Silveira JC, Andrade GM, del Collado M, Sampaio RV, Sangalli JR, Silva LA, Pinaffi FVL, Jardim IB, Cesar MC, Nogueira MFG, Cesar ASM, Coutinho LL, Pereira RW, Perecin F, Meirelles FV (2017) Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. **PLoS One** 12(6):1-25.

da Silveira JC, de Ávila ACFCM, Garrett HL, Bruemmer E, Winger QA, Bouma GJ (2018) Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. **Journal of Endocrinology** 236:25-27.

de Ávila ACFCM, Bridi A, Andrade GM, del Collado M, Sangalli JR, Nociti RP, Junior WAS, Bastien A, Robert C, Meirelles FV, Perecin F, da Silveira JC (2020) Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation. **Biology of Reproduction** 102:362-375.

de Cesaro MP, dos Santos JT, Ferst JG, Nóbrega Jr JE, Rosa PRA, Rovani MT, Ilha GF, Bohrer RC, Ferreira R, Gasperin BG (2018) Natriuretic peptide system regulation in granulosa cells during follicle deviation and ovulation in cattle. **Reproduction in Domestic Animals** 53:710-717.

de Cesaro MP, Macedo MP, dos Santos JT, Rosa PRA, Ludke CA, Rissi VB, Gasperin BG, Gonçalves PBD (2015) Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science** 159:52-59.

Dekel N (2005) Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology** 234:19-25.

Dieci C, Lodde V, Labreque R, Dufort I, Tessaro I, Sirard M-A, Luciano AM (2016) Differences in cumulus cell gene expression. indicate the benefit of a pre-maturation step to improve *in-vitro* bovine embryo production. **Molecular Human Reproduction**, 22:882-897.

dos Santos JT, De Cesaro MP, Ferst JG, Dau AMP, da Rosa PRA, Pasqual BM, Antoniazzi AQ, Gasperin BG, Bordignon V, Gonçalves PBD (2018) Luteinizing hormone upregulates NPPC and downregulates NPR3 mRNA abundance in bovine granulosa cells through activation of the EGF receptor. **Theriogenology** 119:28-34.

Dows SM (1993) Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology** 39:65-79.

Edgar JR (2016) Q&A: What are exosomes, exactly? **BMC Biology**, 14:1-7.

Guaraldo (2021) **Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo**. Brasília: EMBRAPA SIRE: NOTÍCIAS
<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>

Eppig JJ, Downs SM (1984) Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. **Biology of Reproduction** 30:1-11.

Fair T (2003) Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science** 78:203-216.

Ferrazza RA, Garcia HDM, Schmidt EMDS, Mihm Carmichael M, Souza FF, Burchmore R, Sartori R, Eckersall PD, Ferreira JCP (2017) Quantitative proteomic profiling of bovine follicular fluid during follicle development. **Biology of Reproduction** 97(6):835-849.

Ferré LB, Kjelland ME, Strobecch LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ (2020) Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal** 14:991-1004.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA AS (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology** 71:836-848.

Févier B, Raposo G (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Current Opinion in Cell Biology** 16:415-421.

Fragouli E, Wells D (2015) Mitochondrial DNA assessment to determine oocyte and embryo viability. **Seminars in Reproductive Medicine** 3:401-409.

Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modina SC, Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM (2014) Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction** 91(3):1-9.

Gershon E, Plaks V, Dekel N (2008) Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. **Molecular and Cellular Endocrinology** 282:18-25.

Gilchrist RB, Zeng HT, Wang X, Richani D, Smitz J, Thompson JG (2015) Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. **Theriogenology** 84:656-657.

Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. (2004) Selective permeability of gap junction channels. **Biochimica et Biophysica Acta** 1662:96-101.

Guimarães AL, Pereira SA, Kussano NR, Dode MA (2016) The effect of pre-maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Zygote** 24:219-229.

Hao X, Wang Y, Kong N, Zhang Y, Xia G, Zhang M (2016) Epidermal growth factor-mobilized intracellular calcium of cumulus cells decreases natriuretic peptide receptor 2 affinity for natriuretic peptide type C and induces oocyte meiotic resumption in mice. **Biology of Reproduction** 95:1-9.

Hayashi K, Lopes SMCS, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, O'Carroll D, Das PP, Tarakhovskiy A, Miska EA, Surani MA (2008) MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. **PLoS ONE** 5:1-9.

Hoelker M, Held E, Salilew-Wondim D, Schellander K, Tesfaye D (2014) Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development** 26:22-26.

Hoelker M, Schamoll F, Schneider H, Rings F, Gilles M, Tesfaye D, Jennen D, Tholen E, Griese J, Schellander K (2006) Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell count, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. **Reproduction, Fertility and Development** 18:551-557.

Hung W-T, Hong X, Christenson LK, McGinnis LK (2015) Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. **Biology of Reproduction** 93:1-9.

Hung W-T, Navakanitworakul R, Khan T, Zhang P, Davis JS, McGinnis LK, Christenson LK (2021) Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. **Biology of Reproduction**, 97:644-655.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology** 47:23-32.

Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L (2008) Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. **Cell Death and Differentiation** 15:80-88.

IETS - International Embryo Technology Society. Data Retrieval Committee (2019) **2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals by João Viana.**

https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2019.pdf

Jaffe LA, Egbert JR (2017) Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. **Annual Review of Physiology** 79:237-260.

Jan AT, Rahman S, Khan S, Tasduq SA, Choi I (2019) Biology, pathophysiological role, and clinical implications of exosomes: A critical appraisal. **Cells** 8:99, 1-19.

Kalous J, Tetkova A, Kubelka M, Susor A (2018) Importance of ERK1/2 in regulation of protein translation during oocyte meiosis. **International Journal of Molecular Sciences** 19:1-21.

Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P (2006) Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. **Immunology Letters** 107:102-108.

Kim NH, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park SP, Lim JH (2000) The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote** 8:25-32.

Kim N-H, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park SP, Lim JH (2005) The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote** 8:25-32.

Labrecque R, Fournier E, Sirard M-A. (2016) Transcriptome analysis of bovine oocytes from distinct follicle sizes: insights from correlation network analysis. **Molecular Reproduction and Development** 83:558-569.

Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E (2008) Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. **Trends in Cell Biology** 18:199-209.

Li G-P, Liu Y, Bunch TD, White KL, Aston KI (2005) Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase II. **Molecular Reproduction and Development** 71:220-226.

Li Q-Y, Lou J, Yang X-G, Lu Y-Q, Lu S-S, Lu K-H (2016) Effect of the meiotic inhibitor cilostamide on resumption of meiosis and cytoskeletal distribution in buffalo oocytes. **Animal Reproduction Science** 174:37-44.

Lodde V, Franciosi F, Tessaro I, Modena SC, Luciano AM (2013) Role of gap junctions-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 30:1219-1226.

Lodde V, Modena S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM (2007) Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development** 74:740-749.

Lodde V, Modena S, Maddox-Hyttel P, Franciosi F, Lauria A, Luciano AM (2008) Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development** 75: 915-924.

Lonergan P, Fair T (2008) In vitro-produced embryos – Dealing with the warts. **Theriogenology** 69:17-22.

Lonergan P, Fair T (2016) Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Bioscience** 4:255-268.

Luciano AM, Modena S, Vassena R, Milanesi E, Lauria A, Gandolfi F (2004) Role of intracellular cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. **Biology of Reproduction** 70:465-472.

Luciano AM, Franciosi F, Modena SC, Lodde V (2011) Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism. **Biology of Reproduction** 85:1252-1259.

Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V (2014) Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: a journey in company with follicular cells. **Animal Reproduction Science** 149:3-10.

Ludwig A-K, Giebel B (2012) Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 44:11-15.

Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F (2014) Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online** 28:284-299.

Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles importante in intercelular communication. **Journal of Proteomics** 73:1907-1920.

May-Panloup P, Chretien M-F, Malthiery Y, Reynier P (2007) Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. **Current Topics in Developmental Biology** 77:51-83.

Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, Young HS (2011) Structure, signaling mechanism and regulation of natriuretic peptide receptor-guanylate cyclase. **The FEBS Journal** 278:1818-1829.

Moore SG., Hasler JF (2017) A 100-year review: reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science** 100:10314-10331.

Naruse k, Iga K, Shimizu M, Takenouchi N, Akagi S, Somfai T, Hirao Y (2012) Milrinone treatment of bovine oocytes during *in vitro* maturation benefits production of nuclear transfer embryos by improving enucleation rate and developmental competence. **Journal of Reproduction and Development** 58:476-483.

Navakanitworakul R, Hung W-T, Gunewardena S, Davis JS, Chotigeat W, Christenson LK (2016) Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. **Scientific Reports** 6:1-14.

Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AL, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA (2008) Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development** 135:3229-3238.

Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA (2009) Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development** 136: 1869-1878.

Ow Y-LP, Green DR, Hao Z, Mak TW (2008) Cytochrome c: functions beyond respiration. **Molecular Cell Biology** 9:532-542.

Quetglas MD, Adona PR, Bem THC, Pires PRL, Leal CLV (2010) Effect of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals** 45:1074-1081.

Racedo SE, Rawe VY, Niemann H (2012) Dynamic changes of Golgi apparatus during bovine *in vitro* oocyte maturation. **Reproduction** 143:439-447.

Regassa A, Rings F, Hoelker M, Cinar U, Tholen E, Looft C, Schellander K, Tesfaye D (2011) Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cell. **BMC Genomics** 12:57. doi: 10.1186/1471-2164-12-57.

Revelli A, Piana LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P (2009) Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproductive Biology and Endocrinology** 4:7-40.

Richani D, Gilchrist RB (2018) The epidermal growth factor network: role in oocytes growth, maturation and developmental competence. **Human Reproduction Update** 24(1):1-14.

Richard S, Baltz JM (2014) Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocytes complex. **Biology of Reproduction** 90(6):1-10.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development** 61:234-248.

Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF (2010) Formation of ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology of Reproduction**, 82:1021-1029.

Roelen BAJ (2020) Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development** 32:98-103.

Sahu K, Gupta A, Sharma A, Tiwari M, Pandey AN, Prasad S, Yadav PK, Pandey AK, Shrivastav TG, Chaube SK (2018) Role of granulosa cell mitogen-activated protein kinase 3/1 in gonadotropin-mediated meiotic resumption from diplotene arrest os mammalian oocytes. **Growth Factors** 38:41-47.

Sánchez F, Smitz J (2012) Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1822:1896-1912.

Shu Y, Zeng H, Ren Z, Zhuang G, liang X, Shen H, Yao S, Ke P, Wang N (2008) Effects of cilostamide and Forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction** 23:504-513.

Sirard MA (2001) Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology** 55:1241-1254.

Smitz JEJ, Thompson JG, Gilchrist RB (2011) The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. **Seminars in reproductive medicine** 29-1:24-37.

Sohel MMH, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, Rings F, Uddin MJ, Spencer TE, Schellander K, Tesfaye D (2013) Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PLoS ONE** 8:1-16.

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG (2003) Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update** 9-1:35-48.

Théry C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology** 9:581-593.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles** 7:1-43.

Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB (2002) Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Developmental Biology** 244:215-225.

Thomas RE, Thompson JG, Armstrong DT, Gilchrist RB (2004) Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biology of Reproduction** 71:1142-1149.

van den Hurk R, Zhao J (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology** 63:1717-1751.

Wang X, Meng K, Wanh H, Wnag Y, Zhao Y, Kang J, Zhang Y, Quan F (2021) Identification of small extracellular vesicles subtypes in follicular fluid: insights into the function and miRNA profiles. **Journal of Cellular Physiology** 236:5633-5645.

Watson AJ, de Souza Paul, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME (2000) Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction** 62:355-364.

Yang L, Wei Q, Ge J, Zhao X, Ma B (2016) MAPK3/1 is conducive to luteinizing hormone-mediated C-type natriuretic peptide decreases in bovine granulosa cells. **Journal of Reproduction and Development** 62:137-142.

Ying W, Hengqin W, Xiaomei W, Yunqi Z, Fusheng Q (2021) Extracellular vesicles of bovine small follicular fluid promote ovarian cortical stroma cell proliferation and steroidogenesis. **Reproduction in Domestic Animals** 56:1425-1434.

Zhang M, Su Y-Q, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ (2011) Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes *in vitro*. **Reproduction-Development** 152:4377-4385.

Zhang T, Zhang C, Faz X, Li R, Zhang J (2017) Effect of C-type natriuretic peptide pretreatment on in vitro bovine oocyte maturation. **In vitro Cellular & Developmental Biology Animal** 53:199-206.