

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

**EFEITOS DO FSH, AMP_c, hCG E COMBINAÇÕES, NO MEIO DE MATURAÇÃO E
INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

**Tainara Iorrani Silva Ribeiro
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Novembro de 2020**

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

**EFEITOS DO FSH, AMPc, hCG E COMBINAÇÕES, NO MEIO DE MATURAÇÃO E
INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tainara Iorrani Silva Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Co-Orientadora: Dra. Marina Ragagnin de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2020

R484e

Ribeiro, Tainara Iorrani Silva

Efeitos do FSH, AMPc, hCG e combinações, no meio de maturação e influência na produção in vitro de embriões bovinos / Tainara

Iorrani Silva Ribeiro. -- Jaboticabal, 2020

44 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Marina Ragagnin de Lima

1. Produção in vitro. 2. Gotas lipídicas. 3. Embriões. 4. Reprodução.
I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

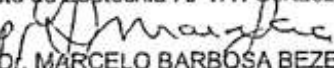
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DO FSH, AMPc, hCG E COMBINAÇÕES, NO MEIO DE MATURAÇÃO E INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

AUTORA: TAINARA IORRANI SILVA RIBEIRO
ORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA
COORIENTADORA: MARINA RAGAGNIN DE LIMA

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


Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. GUILHERME FAZAN ROSSI (VIDEOCONFERÊNCIA)
Instituto de Zootecnia-APTA / Sertãozinho/SP


Prof. Dr. MARCELO BARBOSA BEZERRA (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidade Federal do Semi Árido-UFERSA / Mossoró/RN

Jaboticabal, 28 de setembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tainara Iorrani Silva Ribeiro – Nascida na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, na data de 05 (cinco) de outubro de 1990. Formou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro) (2011-2017). Atualmente mestranda pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp/Fcav) na área de Reprodução Animal (CAPES 2018/2020). Durante a graduação, trabalhou como bolsista de Iniciação Científica na área de Clínica e Cirurgia em Pequenos Animais; atuou como bolsista de Iniciação Científica na área de Reprodução Animal, com ênfase em Biotecnologia da Reprodução, pelo Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA-UENF); Trabalhou no programa de extensão Universidade Aberta, na área da Reprodução Animal com ênfase em exames andrológicos e coleta de sêmen em bovinos da região norte fluminense; realizou intercâmbio, pelo período de 1 (um) ano, na modalidade graduação sanduíche, através do programa federal Ciências sem Fronteiras, pela *Università degli Studi di Milano* – Milão, Itália (2013/2014).

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus mentores Murilo (in memoriam) e Rita, vocês sempre serão meus exemplos de vida. Às minhas irmãs Tamila e Tamara, pela inspiração, amizade e fortaleza. À madrinha Déa, por acreditar em mim, me incentivar e apoiar em todos os momentos. E ao meu amor, Thiago, pelo companheirismo, por nunca me deixar desistir, e por sonhar meus sonhos comigo e fazer parte deles.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me manteve firme nos momentos de dificuldade e desânimo. Em especial à igreja São Lucas (Juiz de Fora, MG), lugar de paz, onde eu posso ter o melhor acanto, homilia e palavras.

Aos meus pais, Murilo Ribeiro (*in memoriam*) e Rita de Cássia pelo imensurável apoio em todas as etapas da vida. Pai, obrigada pelo ensinamento que se fez muitas vezes através de olhares. Sinto sua falta todos os dias, mas como um anjo, você se faz presente na minha vida e eu sei que nunca estarei só. Mãe, obrigada pelos conselhos diários, por me ensinar a lutar e nunca desistir, e pela melhor amizade que uma filha pode ter. Sem vocês eu não teria conseguido!

Às minhas irmãs, Tamila e Tamara, que foram o alicerce nessa trajetória. Obrigada por compartilharem comigo os sentimentos mais extremos, por compreenderem minhas ausências e por terem os melhores conselhos nas minhas maiores dificuldades. Vocês sempre serão minhas inspirações de vida!

Aos meus sobrinhos e afilhados, Maria Antônia, Murilo e Cauã, que me fazem acreditar e lutar todos os dias por um mundo melhor.

Ao meu amor e melhor amigo, Thiago Pagliari, pelo companheirismo de todos os dias, por me reerguer e enxugar as lágrimas que caíram nos momentos de dificuldade, pelas palavras de apoio, por se fazer presente nos meus planos e sonhos, e me ajudar pessoal e profissionalmente em todos os sentidos. Com você tudo é mais leve e eu sou muito mais feliz. Te amo!

Aos familiares e amigos, em especial à madrinha Déa, que sempre acreditou nos meus sonhos e nunca mediu esforços para realizá-los. Obrigada por tudo!

Ao orientador Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e à Bioklone® Reprodução Animal, pela oportunidade de concluir esse sonho, e por intensificar minha paixão e conhecimentos na complexa área da Biotecnologia da Reprodução. Agradeço pelos ensinamentos, confiança, dedicação e ânimo demonstrados durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Roberta Vantini, pelo auxílio nos preparos dos meios e aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal da UNESP-FCAV, especialmente a Edson e Ivo, por alegrar e fazer mais leve cada dia de trabalho.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da UNESP-FCAV, pelos ensinamentos e experiências. Por fim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, agradeço!

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Maturação oocitária	2
2.2 Regulação da maturação oocitária	4
2.3 Maturação oocitária in vivo versus <i>in vitro</i>	7
2.4 Limitações na maturação oocitária <i>in vitro</i>	9
2.5 Regulação química da maturação nuclear.....	10
2.6 Ação do hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a maturação oocitária....	12
2.7 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	14
3. HIPÓTESES	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo geral	17
4.2 Objetivos específicos.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1 Local do experimento.....	16
5.2 Produtos.	17

5.3	Preparação dos meios de maturação e lavagem dos oócitos.....	17
5.4	Colheita dos ovários, classificação e seleção dos oócitos	17
5.5	Delineamento experimental.	18
5.5.1	Pré-experimento – Determinação da concentração de FSH e AMPc.	18
5.5.2	Experimento.....	19
5.6	Avaliação da maturação nuclear em oócitos bovinos	20
5.7	Avaliação da maturação citoplasmática por meio da marcação de grânulos corticais	21
5.8	Avaliação da maturação citoplasmática por meio da distribuição de mitocôndrias no ooplasma.....	22
5.9	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	23
5.10	Quantificação lipídica dos embriões bovinos.	24
5.11	Análise estatística	25
6.	RESULTADOS	25
6.1	Pré-experimento	25
6.2	Análise da maturação nuclear.....	26
6.3	Análise da maturação citoplasmática por meio da marcação de grânulos corticais.....	26
6.4	Análise da maturação citoplasmática por meio da distribuição de mitocôndrias no ooplasma.....	28
6.5	Análise da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVE)	29
6.6	Análise da quantificação lipídica dos embriões de PIVE.....	30
7.	DISCUSSÃO	30
8.	CONCLUSÕES.....	35
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema demonstrativo do delineamento experimental 19
- Figura 2.** Fotomicrografias da progressão nuclear de oócitos bovinos. Oócito em estágio de vesícula germinativa – VG (A); oócito em metáfase I (MI) – (B) e oócito em metáfase II (MII) com extrusão do 1º corpúsculo polar – (C). ..21
- Figura 3.** Fotomicrografias ilustrando as categorias da distribuição de grânulos corticais no ooplasma após a MIV de oócitos bovinos. Os oócitos foram classificados em *Periferia* (A), *Transição* (B) ou *Disperso* (“Clusters”) (C).22
- Figura 4.** Fotomicrografias ilustrando as diferentes categorias da distribuição de mitocôndrias ativas no ooplasma após a MIV de oócitos bovinos. Os oócitos foram classificados em: *Periferia* (A), *Transição* (B) ou *Disperso* (C)..... 23

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Análise da progressão nuclear de oócitos bovinos de acordo com os testes-pilotos de dose-respostas, a partir de diferentes concentrações de FSH e AMPc, com 16h e 24h de MIV25
- Tabela 2.** Análise da progressão nuclear de oócitos bovinos, em 24h de MIV, de acordo com os grupos experimentais 26
- Tabela 3.** Avaliação da distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos submetidos à 24h de MIV, de acordo com os grupos experimentais27
- Tabela 4.** Avaliação da localização de mitocôndrias em oócitos bovinos submetidos à 24h de MIV, de acordo com os grupos experimentais 28
- Tabela 5.** Resultado da produção embrionária *in vitro* a partir de oócitos bovinos maturados por 24 horas, de acordo com os grupos experimentais 29
- Tabela 6.** Quantificação percentual da área lipídica dos embriões de PIV de acordo com os grupos experimentais 30

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifostato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
BSA-FAF	Albumina sérica bovina livre de ácidos graxos
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CPT	Carnitina palmitoil transferase 1
DGAT2	Diacilglicerol aciltransferase 2
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Grama
GC	Grânulos corticais
GI	Grau I
GII	Grau II
GIII	Grau III
LH	Hormônio luteinizante
MII	Metáfase II
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCI	Massa celular interna
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
µL	Microlitro
µg	Micrograma
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
nM	Nanomolar
O ₂	Oxigênio
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVA	Alcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RE	Retículo endoplasmático
SB	Solução de bloqueio
SOF	Fluido sintético de tuba uterina

EFEITOS DO FSH, AMPc, hCG E COMBINAÇÕES, NO MEIO DE MATURAÇÃO E INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO

A maturação oocitária é um complexo bem orquestrado que culmina na liberação de um oócito capaz de ser fertilizado, permitindo assim, o desenvolvimento embrionário. A maturação *in vitro* (MIV) é uma das etapas determinantes para o sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a não competência oocitária nesta fase altera drasticamente a taxa de produção embrionária. Apesar de todos os esforços para a melhoria da PIVE, apenas uma parcela de 35 a 40% dos oócitos bovinos maturados *in vitro*, desenvolvem-se até o estágio de blastocisto. Acredita-se que a falta de sincronia existente entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática oocitária seja um fator limitante na qualidade da PIVE. Dessa forma, o uso de reguladores durante a MIV, tem se destacado e melhorado a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos, e conseqüentemente, a taxa de produção embrionária. Nesse contexto, o presente estudo teve como finalidade avaliar a influência dos reguladores de maturação - hormônio folículo estimulante (FSH), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e gonadotrofina coriônica humana (hCG), e suas combinações - na presença de albumina sérica bovina (BSA) como fonte protéica, sobre a MIV de oócitos bovinos, comparados ao grupo controle, com soro fetal bovino (SFB) sem adição dos reguladores. Foram formados dez grupos experimentais (T1: SFB, T2: FSH, T3: AMPc, T4: hCG, T5: FSH+AMPc, T6: FSH+hCG, T7: AMPc+hCG, T8: FSH+AMPc+hCG e T9: (FSH+AMPc) por 12 horas + hCG nas outras 12 horas, T10: BSA). Foram avaliadas as taxas de maturação nuclear e citoplasmática, de acordo com a presença de metáfase II (MII), migração dos grânulos corticais e mitocôndrias, capacidade em produzir embriões e acúmulo lipídico embrionário. Os resultados demonstraram que o uso do BSA durante a MIV provocou atraso na retomada da meiose em todos os grupos experimentais analisados, comparados à maturação com SFB ($p < 0,05$). Porém, a distribuição de grânulos corticais e de mitocôndrias no ooplasma, bem como a taxa de produção embrionária, apresentaram melhores resultados quando o SFB foi utilizado ($p < 0,05$). Além disso, a substituição do SFB pelo BSA na MIV não reduz os níveis lipídicos dos embriões produzidos *in vitro* (PIV) ($p > 0,05$). Conclui-se que, o uso do BSA durante a MIV de oócitos bovinos, permite o atraso da reativação da meiose, contudo, a presença do SFB nessa etapa é de suma importância para a maturação das organelas citoplasmáticas e na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: Produção *in vitro* (PIV), gotas lipídicas, mitocôndrias, embriões, reprodução.

EFFECTS OF FSH, AMPc, hCG AND COMBINATIONS, IN THE MIDDLE OF MATURATION AND INFLUENCE ON THE IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

ABSTRACT

Oocyte maturation is a well-orchestrated complex that culminates in the release of an oocyte capable of being fertilized, thus allowing embryonic development. *In vitro* maturation (IVM) is one of the determining steps for the success of *in vitro* production of embryos (IVPE) and the lack of oocyte competence in this phase dramatically changes the rate of embryonic production. Despite all efforts to improve IVPE, only a portion of 35 to 40% of bovine oocytes matured *in vitro*, develop until the blastocyst stage. It is believed that the lack of synchrony between nuclear maturation and oocyte cytoplasmic maturation is a limiting factor in the quality of IVPE. Thus, the use of regulators during IVM, has highlighted and improved the synchrony of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation, and consequently, the rate of embryonic production. In this context, the present study aimed to evaluate the influence of maturation regulators - follicle stimulating hormone (FSH), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and human chorionic gonadotropin (hCG), and their combinations - in the presence of bovine serum albumin (BSA) as a protein source, on the bovine oocyte IVM, compared to the control group, with fetal bovine serum (FBS) without the addition of regulators. Ten experimental groups were formed (T1: FBS, T2: FSH, T3: cAMP, T4: hCG, T5: FSH + cAMP, T6: FSH + hCG, T7: cAMP + hCG, T8: FSH + cAMP + hCG and T9: (FSH + cAMP) for 12 hours + hCG in the other 12 hours, T10: BSA). Nuclear and cytoplasmic maturation rates were evaluated according to the presence of metaphase II (MII), migration of cortical granules and mitochondrias, ability to produce embryos and embryonic lipid accumulation. The results demonstrated that the use of BSA during IVM caused a delay in the resumption of meiosis in all experimental groups analyzed, compared to maturation with FBS ($p < 0,05$). However, the distribution of cortical granules and mitochondrias in the ooplasm, as well as the rate of embryonic production, showed better results when FBS was used ($p < 0,05$). In addition, the replacement of FBS by BSA in IVM does not reduce the lipid levels of embryos produced *in vitro* (IVP) ($p > 0.05$). It is concluded that the use of BSA during IVM of bovine oocytes allows the delay of meiosis reactivation, however, the presence of FBS in this stage is of paramount importance for the maturation of cytoplasmic organelles and *in vitro* production of embryos bovine.

Keywords: *In vitro* production (IVP), lipid droplets, mitochondrias, embryos, reproduction.

1. INTRODUÇÃO

A maturação oocitária é uma das etapas determinantes para o sucesso da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a não aquisição da competência oocitária nesta fase altera drasticamente o desenvolvimento, sobrevivência e implantação dos embriões, o que influencia diretamente na taxa de blastocistos produzidos (GILCHRIST, et al., 2007; PINTO, 2012).

O Brasil, atualmente, ocupa o segundo lugar mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro* (IETS, 2019). Apesar dos esforços para melhorar as taxas de produção embrionária, apenas 35% a 40% dos oócitos bovinos colocados para MIV conseguem se desenvolver até o estágio de blastocisto (SIRARD et al., 2006; SALHAB, et al., 2011; SALHAB, et al., 2013). Acredita-se que a falta de sincronia existente entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática oocitária seja um fator limitante na qualidade da PIVE. Dessa forma, a utilização de reguladores durante a fase maturacional se torna uma ferramenta importante como maneira de retardar a velocidade da maturação nuclear de modo que ocorra mais sincronizada com a citoplasmática, se assemelhando ao que ocorre *in vivo*.

O hormônio folículo estimulante (FSH) é uma glicoproteína sintetizada e secretada pela adenohipófise, e responsável por regular o desenvolvimento, crescimento e a maturação das gônadas na puberdade (COSTA et al., 2014). No hipotálamo, o GnRH é produzido e atinge a adenohipófise por meio do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, causando a liberação dos hormônios gonadotróficos: FSH e LH (BARUSELLI et al., 2004). Ambos irão atuar nos ovários, sendo o FSH responsável pelo crescimento dos pequenos folículos (ADAMS et al., 1992), enquanto o LH atua no desenvolvimento final e ovulação do folículo dominante (GINTHER et al., 1998). Considerando a importância do FSH no desenvolvimento folicular, essa gonadotrofina vem sendo amplamente empregada no meio de MIV, no intuito de aprimorar o processo de maturação (GULART, 2009).

Dentre os fatores envolvidos na regulação meiótica, também se destaca o AMP cíclico (AMPC), o qual pode ser sintetizado pelo próprio oócito ou fornecido pelas células da granulosa por meio das junções do tipo *gap*. Altos níveis intra-

oocitários de AMPc mantém o oócito em estágio de vesícula germinativa através da supressão da atividade do fator promotor da maturação (MPF). Em adição, as células somáticas do folículo também fornecem GMP cíclico (GMPc) para o oócito, o qual inibe a fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3), uma enzima que degrada o AMPc (BILODEAU-GOESEELS, 2011).

O hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) possui potente efeito e ação semelhante ao hormônio luteinizante (LH) em bovinos, O hCG caracterizado por prolongar a vida útil do corpo lúteo (CL), aumentar a síntese de progesterona, induzir a ovulação durante o ciclo estral, promover a formação de corpos lúteos acessórios quando aplicado na fase lútea precoce e modificar a dinâmica das ondas foliculares, aumentando a frequência dos ciclos foliculares dominantes. Sabe-se que o hCG possui efeito mais duradouro quando comparado ao LH e atua nas células ovarianas de forma independente da glândula pituitária. Dessa forma, vem sendo cada vez mais utilizado em vacas subférteis e em protocolos de estro e sincronização (DE RENSIS et al. 2010).

Diante disso, o presente estudo tem como finalidade avaliar o efeito do FSH, AMPc, hCG e suas combinações como reguladores de atividades da maturação e produção *in vitro* de embriões bovinos, como uma estratégia para aprimorar o entendimento dos fatores que envolvem esse processo e contribuir para melhorar a qualidade da maturação do oócito *in vitro* e, conseqüentemente, a taxa de produção embrionária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Maturação oocitária

A maturação oocitária se caracteriza por uma série de eventos sequenciais e sincronizados que preparam o gameta feminino para ser fertilizado pelo espermatozoide e se tornar apto para gerar um embrião. De acordo com os eventos intracelulares ocorridos durante o processo de maturação, a mesma pode ser dividida em nuclear, citoplasmática e molecular (GOTTARDI E MINGOTI, 2009). Acredita-se que a maturação nuclear e a citoplasmática devem ocorrer

simultaneamente para que se atinja o maior grau de competência oocitária (SIDIQUI et al., 2009).

A oogênese e a foliculogênese se iniciam antes do nascimento do animal. Desde a sua vida fetal, o oócito tem seu processo meiótico estacionado na fase de diplóteno da prófase I, se mantendo no estágio de vesícula germinativa (VG) até a puberdade (BILODEAU-GOESEELS, 2011; PINTO, 2012). A retomada da meiose ocorre no período púbere, como consequência do pico de hormônio luteinizante (LH), seguida de diversas modificações que permitem adequado desenvolvimento oocitário (GILBERT et al., 2011). Após o pico de LH e a retomada da meiose, o oócito progride do estágio de VG até a metáfase II (MII) (GOTTARDI E MINGOTI, 2009), sendo então observados, o rompimento da carioteca, a condensação dos cromossomos e a extrusão do primeiro corpúsculo polar (MEINECKE et al., 2001). É nesse período que se considera a obtenção da maturação nuclear. Se houver fertilização, a meiose progride e se completa, caso contrário, o oócito se mantém em estágio MII até ser degenerado (SOMFAI et al., 2011).

A maturação citoplasmática envolve a reorganização das organelas citoplasmáticas, estocagem de RNA mensageiro, proteínas e de fatores de transcrição (FERREIRA et al., 2009). É o momento em que se observa a mudança na morfologia das estruturas intracelulares e a intensa atividade dos microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto envolvidos na redistribuição das organelas (FERREIRA et al. 2009; NABENISHI et al., 2012), etapa de suma importância no bloqueio à polispermia (LIU, 2011; PAULINI et al., 2014).

Em oócitos imaturos, as mitocôndrias se encontram dispostas na periferia celular e, no fim do processo maturacional, elas reduzem de tamanho e se dispõem próximas ao núcleo (HYTTEL et al., 1997; MAO et al., 2014). Sua principal função é promover o suprimento energético da célula, que é fundamental durante o período de maturação oocitária (NABENISHI, et al., 2012). Nesse intuito, as gotas lipídicas tendem a seguir a mesma conformação das mitocôndrias. Estas estruturas tendem a migrar pelo citoplasma em direção ao núcleo para adequada maturação, porém, se dispõem na periferia da célula em oócitos não maturados (DEL COLLADO, 2013).

O aparato de Golgi na ausência de maturação também está presente na periferia da célula e migra em direção ao centro no final da primeira divisão meiótica,

se tornando quase ausente quando a maturação se torna completa. Dentre outras funções, ele tem importância no transporte intracelular, na síntese protéica e no processamento de moléculas através de vias endocíticas (MAO et al., 2014)..

Os grânulos corticais são organelas oriundas do aparato de Golgi e de forma diferente do que ocorre com as mitocôndrias e as gotas de lipídeos, essas organelas tendem a aumentar em número e migrar através do citoplasma, assumindo uma posição adjacente a membrana plasmática (LIU, 2011; ROMAR et al., 2012). A exocitose dos grânulos corticais é um dos mecanismos primordiais utilizados pelo oócito para prevenção da polispermia (PAULINI et al., 2014).

Já o retículo endoplasmático, se encontra disperso no ooplasma quando no estágio de vesícula germinativa, e se apresenta na forma de aglomerados em regiões corticais de todo o citoplasma após a maturação (LIPPINCOTT-SCHWATRZ et al., 2000; STRICKER, 2006; FERREIRA et al., 2009). Ele está envolvido na síntese e degradação de proteínas, além de fazer parte do metabolismo lipídico. Durante o processo maturacional, a concentração e atividade ribossomal se encontram altas devido a intensa síntese protéica (MAO et al., 2014).

Além dessas mudanças, durante a maturação acontece o acúmulo de proteínas e ácidos nucléicos, caracterizando a maturação molecular. Esse evento assume um papel de grande importância, uma vez que engloba a síntese de proteínas necessárias para os eventos posteriores que permitirá adequada embriogênese. Nesse processo ocorrem repetidas etapas de tradução na célula a partir da estocagem de RNA mensageiro e, subsequente síntese de proteínas, ideais para as fases de maturação, fertilização, formação de pró-núcleos e desenvolvimento embrionário inicial (SIRARD, 2001; WATSON, 2007; FERREIRA, 2009).

2.2. Regulação da maturação oocitária

A regulação da maturação oocitária depende diretamente do Fator Promotor de Maturação (MPF), sendo este considerado o regulador universal do ciclo celular meiótico. O MPF é um complexo heterodimérico constituído por duas subunidades, a subunidade catalítica (p34^{cdc2} ou CDK1, quinase dependente de ciclina), responsável

pela divisão celular, e outra regulatória (ciclina B), envolvida na ativação do complexo MPF nos mamíferos (DEKEL, 2005).

O MPF participa tanto da mitose como da meiose de todos os seres eucariotos. Após a sua ativação, ele atua na fosforilação de outras proteínas quinases que são destinadas ao rompimento do envoltório nuclear, regulação do fuso meiótico, condensação dos cromossomos e à reorganização intracelular (GOTTARDI E MINGOTI, 2009; CIAPA et al., 2013). Na sua forma inativa, também conhecida como pré-MPF, os resíduos treonina-14 e tirosina-15 se encontram fosforilados. Somente quando ocorre a desfosforilação desses resíduos pela cdc 25-fosfatase e a união de suas subunidades, é que o MPF se torna ativo. Para ativação da enzima cdc 25-fosfatase, acredita-se que as proteínas quinases *MOS* e *MAPK* (*mitogen-activated kinase protein*) possam estar envolvidas (FERRARI et al., 2011).

Durante a regulação da retomada da meiose, o MPF é o principal responsável pelo início da maturação oocitária visto que sua ativação precede ou ocorre concomitantemente ao rompimento da VG (CONTI, 2007; OLIVEIRA, 2009).

A atividade do MPF não é constante e tem perfil oscilatório durante todo o período de maturação (JOSEFSBERG et al., 2003). Uma vez ativo para a retomada da meiose, sua atividade se mantém elevada até o estágio MII, onde alcança seu maior nível. Posteriormente, sofre declínio antes da extrusão do primeiro corpúsculo polar (LI et al., 2014), após isso há um novo pico desse fator que culmina com o início da meiose II (CROCOMO et al., 2011). Após a fertilização ou ativação do oócito por partenogênese, o MPF é degradado (KOVO et al., 2006). Apesar de o seu papel ser conhecido durante a maturação nuclear oocitária, ainda não estão totalmente elucidados os mecanismos responsáveis pela ativação do MPF, mas sabe-se que mensageiros como o AMPc e o GMPc e enzimas como as MAPKs, a fosfodiesterase - 3 (PDE3), a proteína quinase A (PKA), a PI3K e a Akt estão envolvidos (PARK et al., 2011).

O AMPc (3´5´- adenosina-monofosfato-cíclico) é uma molécula sinalizadora e um dos principais agentes responsáveis pelo controle da retomada da meiose e maturação oocitária dos vertebrados. É sintetizado no interior das células a partir do ATP sob ação da adenilato ciclase, enzima acoplada à proteína G de membrana e totalmente dependente desta para ser ativada ou inibida. O AMPc pode ser

produzido pelo próprio oócito, mas elevadas concentrações são produzidas pelas células do *cumulus* e transferidas para o oócito através das junções do tipo *gap* (DEKEL, 2005).

Alta concentração de AMPc intraoocitário culmina na ativação de proteínas quinases dependentes dessa molécula, como a proteína quinase A (PKA). Uma vez ativa, a PKA aumenta a atividade de proteínas subsequentes como o Myt (inibidor de CDK1), que fosforilam o MPF e o mantém na forma inativa (MOGOLLÓN-WALTERO, 2013). Além disso, a atividade da PKA é responsável por inibir a atividade da MAPK, culminando na ausência de desfosforilação do MPF e, conseqüentemente, na inibição da sua atividade, o que irá manter o oócito no estágio de vesícula germinativa e impedir que ocorra a retomada da meiose (BILODEUAU-GOESEELS, 2011; PINTO, 2012, NICHIMURA et al., 2012).

O AMPc é uma molécula que possui meia-vida curta, sendo degradada no interior da própria célula que a sintetiza a partir da ação das fosfodiesterases presentes nos oócitos. Segundo Norris et al. (2009), o GMPc (monofosfato de guanosina cíclico), é outro mensageiro celular, produzido pelas células do *cumulus* e também transferido para o oócito por meio das junções tipo *gap*. Ele atua interferindo no aumento da concentração de AMPc, culminando na intensa atividade da PKA, e impedindo, portanto, a retomada da meiose e a ocorrência da maturação.

As MAPKs se enquadram na família das proteínas quinases serina-treonina, ativadas por mitógenos e reguladas por sinais extracelulares (ERK). Logo, elas se ativam por esses sinais e os transferem para o meio intracelular (FERRARI et al., 2011). Essas enzimas atuam em diferentes tipos celulares fosforilando e ativando diversas quinases e vários substratos (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

A via da MAPK é ativada ou inativada de acordo com a concentração de AMPc e da atividade da proteína quinase A (FAN E SUN, 2004). A sua ativação *in vivo* ocorre durante a retomada da meiose pelos oócitos. Quando os mesmos são cultivados *in vitro*, apesar do rompimento da vesícula germinativa ocorrer de forma espontânea, é de extrema importância a ativação dessa proteína para os eventos posteriores à maturação nuclear (LIANG et al., 2007; CIAPA et al., 2013).

Diante disso, a regulação da maturação oocitária se resume em: *In vivo*, o pico de LH no final do ciclo estral é o responsável pelo fechamento das junções

entre as células do *cumulus* e o oócito. *In vitro*, o fechamento das junções se dá após a remoção dos complexos *cumulus oophorus* (CCOs) do ambiente folicular. Em ambas as situações há interrupção da oferta de metabólitos e de moléculas bloqueadoras da retomada da meiose, como o AMPc e GMPc. Ao diminuir a concentração de GMPc e AMPc intraocitários, estará inibida a atividade da PKA. A queda na atividade da PKA irá proporcionar a ativação das proteínas quinases *MOS* e a *MAPK*, o que irá reduzir os níveis de *Myt* acarretando na ativação da fosfatase - *CDC25B*. O aumento na atividade da *CDC25B* será responsável por desfosforilar a *CDK1*, subunidade catalítica do MPF resultando na sua ativação e, finalmente, na retomada da meiose (VACCARI et al., 2008).

2.3. Maturação oocitária *in vivo* versus *in vitro*

A retomada da meiose após a retirada do oócito do ambiente folicular foi descrita pela primeira vez nos anos 30 (PINGUS E ENZMANN, 1935), porém, somente em meados dos anos 60, a maturação *in vitro* (MIV) foi reconhecida como uma importante etapa para a PIVE (EDWARDS, 1965). Desde então, muitos esforços têm sido feitos para aperfeiçoar as condições no processo da MIV, visando obter melhor qualidade e capacitação dos oócitos e, conseqüentemente, otimizar a taxa de produção embrionária (LONERGAN, 2008).

Uma vez retirado do folículo, o oócito completa espontaneamente a maturação nuclear, atingindo, assim, o estágio de metáfase II sem a necessidade de um meio com suplementação mais complexa para a maturação. Já a maturação citoplasmática, que tem papel fundamental no desenvolvimento e na capacitação oocitária, depende exclusivamente de boas condições de cultivo (SALHAB et al., 2011). Com isso, vários fatores são considerados, como a adição de hormônios: hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), e o estradiol (E2), e também o uso de soros (soro de vaca em estro ou soro fetal bovino), como incrementos para os meios de cultivo *in vitro* (GILCHRIST E THOMPSON, 2007).

A maturação oocitária é um importante processo que requer uma aquisição adequada na qualidade oocitária para não afetar o potencial de fertilização e o subsequente desenvolvimento embrionário (SUN E SCHATTEN, 2006). Uma pequena proporção desses oócitos tem potencial de desenvolvimento para levar a

maturação a termo. A eficiência da MIV é limitada pela competência intrínseca de desenvolvimento de cada oócito. Isso se refere ao status bioquímico e molecular que irá permitir ao oócito maduro ser fertilizado normalmente e se desenvolver a embrião, podendo então ser transferido (GILCHRIST E THOMPSON, 2007).

Já se sabe que existe maior proporção de oócitos maturados *in vivo* que conseguem progredir até o estágio de blastocistos, comparados àqueles maturados *in vitro* (RIZOS et al. 2002). Dessa forma, um melhor entendimento no processo de MIV de oócitos bovinos, se torna uma importante ferramenta para o estabelecimento de um ambiente artificial mais próximo possível do encontrado no oviduto (ANTONIOLLI, 2005).

É compreendido que a remoção dos CCOs do ambiente intra-folicular compromete a comunicação entre o oócito e as células somáticas, podendo impossibilitar a ação de diversos fatores reguladores da maturação presentes no fluido folicular e produzir oócitos menos competentes (GILCHRIST et al., 2007).

In vitro, o desenvolvimento de oócito até a fase de blastocisto é limitada a cerca de 30 a 40% dos CCOs fertilizados (RIZOS et al. 2002). A MIV se mostra um fator limitante para um competente desenvolvimento embrionário, já que após uma seleção cuidadosa dos CCOs, somente 35% atinge a maturação citoplasmática (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

Existem diversos fatores que podem influenciar negativamente a qualidade oocitária. Entre eles, a idade dos oócitos, o estágio do ciclo estral, as concentrações hormonais, além de características bioquímicas do fluido folicular, diâmetro e grau de atresia do folículo, e a morfologia ovariana. Inevitavelmente, essa variabilidade afeta a eficiência da capacitação oocitária e por conseqüência, a PIVE (CROCOMO et al., 2019).

Várias estratégias veem sendo utilizadas de modo a proporcionar melhor valor preditivo no potencial da PIVE. A maioria das avaliações é baseada em critérios morfológicos que se relacionam com o *status* fisiológico do folículo. É observado que após a MIV, os oócitos formam um grupo mais heterogêneo morfológicamente, já os CCOs maturados *in vivo*, possuem formação de um grupo mais homogêneo. Além disso, quando comparados, os oócitos maturados *in vitro* apresentam retração dos locais de ligação entre células do *cumulus* e oócito,

retardamento na maturação citoplasmática e expansão incompleta do *cumulus*, além de mudanças na síntese de proteínas e padrões de fosforilação (CROCOMO et al., 2011).

2.4. Limitações na maturação oocitária *in vitro*.

A qualidade dos oócitos e as condições de cultivo a que são submetidos estão entre os fatores determinantes para o sucesso da PIVE. Dessa forma, a etapa de MIV busca cultivar oócitos em condições semelhantes ao que ocorre *in vivo*, para torná-los aptos à fecundação e desenvolvimento embrionário adequados. Atualmente, cerca de 40% dos oócitos fertilizados *in vitro*, chegam ao estágio de blastocisto (LONERGAN E FAIR, 2008). No entanto, quando a maturação ocorre *in vivo*, a taxa de blastocistos por PIVE pode alcançar 80% (PEREIRA et. al., 2010; LONERGAN E FAIR, 2008).

Acredita-se que uma das possíveis causas da baixa taxa de embriões bovinos produzidos *in vitro* seja a falta de sincronia existente entre a maturação nuclear e a citoplasmática (SIRARD, 1989). Com a retirada do oócito do ambiente folicular inibitório por meio de punção e a consequente perda de comunicação entre as células foliculares e o oócito, ocorre redução na oferta de fatores bloqueadores da maturação nuclear (AMPc e GMPc) permitindo, dessa forma, que a maturação nuclear ocorra de forma espontânea e independente da maturação citoplasmática (CROCOMO, 2011). Diante disso, muitos oócitos alcançam a maturação nuclear de forma prematura, sem que tenha completado o desenvolvimento na maquinaria citoplasmática, podendo influenciar de forma negativa na competência oocitária (THOMAS E ARMSTRONG, 2004). Enquanto cerca 80% dos oócitos de MIV atingem o estágio de MII (RIZOS, 2002), estima-se que apenas 60 % destes são capazes de completar a maturação citoplasmática (FERREIRA, 2009).

Considera-se que as condições empregadas na MIV não sejam adequadas o suficiente de modo a proporcionar condições semelhantes às fisiológicas, refletindo negativamente na qualidade oocitária, na sobrevivência dos embriões ao processo de criopreservação e nas taxas de prenhez (NAGAI, 2001). Sabe-se que o desenvolvimento embrionário inicial é fortemente dependente da adequada

maturação citoplasmática (COSTA, 2002), no entanto, muitos autores acreditam que apesar de existirem inúmeros estudos sobre o metabolismo oocitário e sua demanda nutricional, muitos processos bioquímicos que garantem a maturação oocitária, principalmente a citoplasmática, são incompletos ou inadequados na MIV (WHITAKER, 2004). Sendo assim, apesar de elucidada a ocorrência espontânea da maturação nuclear durante a MIV, ainda não há relatos de trabalhos que contornem a falta de sincronia existente entre a maturação nuclear e a citoplasmática, que resultam em menores taxas de desenvolvimento embrionário (NAGAI, 2001).

Com relação à maturação molecular, uma vez retomada a meiose, a transcrição é inibida e a síntese de proteínas se faz baseada nos níveis de RNAm pré-existentes na célula. Porém, muitos oócitos ao atingir a maturação nuclear, ainda não alcançaram o desenvolvimento molecular e não possui a estocagem de proteínas necessárias para a maturação oocitária e na fase inicial da embriogênese (GILCHRIST e THOMPSON, 2007), podendo acarretar na deficiência de competência oocitária e, conseqüentemente, em baixas taxas de concepção.

2.5. Regulação química da maturação nuclear

A falta de sincronia existente entre os eventos nucleares e citoplasmáticos durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, é considerado um dos principais fatores que influenciam na não aquisição da competência oocitária e na baixa taxa de produção *in vitro* de blastocistos. Na intenção de corrigir essa falha da maturação citoplasmática durante a MIV, é que se faz necessário o uso de inibidores que promovam a regulação da via, permitindo que tais eventos intracelulares ocorram de forma sincronizada e semelhante ao encontrado no ambiente folicular (MONGOLLÓN-WALTERO, 2013). Dessa forma, o uso de inibidores vem sendo amplamente estudado (ALBUZ et al., 2010; DALL'ACQUA, 2015; MARQUES, 2011; SASSEVILLE et al., 2009) a fim de promover uma redução na velocidade da progressão da meiose para que os eventos citoplasmáticos sejam alcançados, permitindo resultados satisfatórios no processo de capacitação oocitária (THOMAS E ARMSTRONG, 2004) e nas taxas de blastocistos produzidos *in vitro*.

O IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) é um importante bloqueador meiótico, amplamente utilizado na MIV de oócitos bovinos (LODDE et al., 2013). Ele é considerado um inibidor não específico da enzima fosfodiesterase e, ao inibir a PDE, impede que a mesma realize a degradação do AMPc (DALL'ACQUA, 2015). Dessa forma, os níveis de AMPc permanecem elevados, retardando a retomada da meiose.

O sistema SPOM (simulação da maturação oocitária fisiológica) se caracteriza pela adição de agentes que mantêm o AMPc intraocitário em altas concentrações, permitindo um período mais prolongado da MIV. O sucesso do SPOM na PIV de embriões de camundongo e bovinos incentiva investigações mais detalhadas sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo. O principal intuito do SPOM é permitir um atraso na maturação nuclear para que seja possível o armazenamento de RNAs suficientes para o desenvolvimento embrionário, até que o embrião tenha seu próprio genoma ativado (DALL'ACQUA, 2015). Esse sistema, desenvolvido por Albus e colaboradores (2010), mantém os CCOs por 1 a 2 horas em uma fase de pré-maturação num meio com IBMX e forskolina. Nessa condição, o sistema SPOM foi capaz de aumentar a taxa de fertilização e de blastocistos quando comparado a MIV tradicional (ALBUZ, 2010).

O *wortmannin* (W1628) é responsável por inibir diretamente a PI3K. É um inibidor permeável à membrana plasmática que, em concentrações nanomolares (nM), é caracterizado por ser um inibidor potente, não competitivo e irreversível da PI3K (CARNERO E LACAL, 1998). O *wortmannin* não apresenta efeitos em outras moléculas envolvidas na cascata de sinalização e, dessa forma, vem sendo amplamente utilizado no intuito de esclarecer o papel de PI3K em diversos processos de transdução de sinal (WYMANN et al., 2005; BALISTA, 2010).

Tem sido demonstrado que o *wortmannin* e o LY294002 impedem a maturação meiótica em oócitos bovinos, além de terem efeito regulador nas atividades da cdc2 quinase durante a progressão da meiose dos oócitos (ANAS, 2000). Mogollón-Waltero et. al., 2013, demonstraram que o uso do *wortmannin* para inibição da PI3K em oócitos bovinos promoveu um aumento na taxa de maturação citoplasmática, assim como na taxa de blastocistos.

A triciribina é um inibidor seletivo da Akt. Estudos recentes demonstraram que o uso da triciribina durante a MIV de oócitos bovinos, reduziu a porcentagem de

oócitos imaturos (avaliados por mitocôndrias com distribuição periférica no ooplasma) e aumentou o número de oócitos que possuíam distribuição mitocondrial intermediária (organelas entre o centro e a periferia do ooplasma), característica de oócitos que deram início a maturação citoplasmática (CURCIO, 2019).

Ainda são desconhecidos trabalhos que elucidam o efeito da inibição da atividade do FSH sobre a maturação de oócitos bovinos. Pesquisas recentes demonstraram que a utilização de um inibidor de receptor de FSH (FRBI-8) durante a maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas, promoveu aumento na síntese de inositol-3-fosfato e na produção de esteroides (ZHUANDI, 2017). Já outros pesquisadores evidenciaram que a utilização de um peptídeo sintético a partir de um fragmento do inibidor de FSH durante a fase folicular em saguis (*Callithrix jacchus*), influencia negativamente na indução da fase lútea e na regressão do corpo lúteo, comprometendo diretamente a fertilidade dos animais (WADIA, 2003).

2.6. Ação do hormônio folículo estimulante (FSH) durante a maturação

É compreendido que a maturação oocitária, ou seja, a retomada da meiose até o estágio de metáfase II depende de uma série de fatores e dentre eles, destaca-se o FSH. Além de estar relacionado com o início da maturação, o FSH é capaz de influenciar o citoesqueleto e a polarização do citoplasma do oócito (GULART, 2009). Acredita-se também que o cultivo temporário de oócitos *in vitro*, em baixa concentração de gonadotrofinas, influencia positivamente no desenvolvimento de oócitos oriundos de folículos antrais pequenos (FARIN et. al., 2007)

O hormônio FSH é uma glicoproteína sintetizada pelas células gonadotróficas situadas na adenohipófise (SARAIVA et al., 2010). Durante a foliculogênese, junto à ação de outros hormônios e fatores de crescimento como, hormônio luteinizante (LH), hormônio do crescimento (GH) e tireotropina (TSH), o FSH desempenha papel primordial na manutenção da viabilidade, crescimento e maturação folicular (COSTA, 2014; SARAIVA et al., 2010).

O FSH exerce sua atividade por meio de receptores específicos nas células alvo da superfície celular, porém, seu mecanismo de ação e a transdução de sinal

nas células germinativas ovarianas ainda não estão completamente elucidados (LIU et al., 2010).

Acredita-se que a regulação da sua atividade esteja diretamente relacionada com os níveis de AMPc e de proteína quinase A (PKA) (DANIAL et al., 2003). A via de sinalização do AMPc é ativada a partir da interação ligante-receptor (FSH/FSHr) que irá ativar a enzima adenilciclase, responsável por converter ATP intracelular em AMP-cíclico. O AMPc será responsável por regular outras proteínas, resultando em alterações fisiológicas na célula e quando em altas concentrações, é capaz de impedir a retomada da meiose e a ocorrência da maturação. A ativação da via AMPc/PKA e da MAPK irá produzir o substrato fator de transcrição CREB, principal envolvido na expressão gênica relacionada a proliferação e estereoidogênese das células da granulosa (HUNZICKER-DUNN & MAIZELS, 2006).

Sabe-se que a suplementação de FSH num meio de maturação oocitária, induz o aumento transitório do AMPc, o que pode culminar no bloqueio da retomada da meiose e a não ocorrência da maturação (RICHARDS, 1980). Contudo, a interação do FSH com seu receptor irá desencadear diversas modificações intracelulares que serão fundamentais na regulação da proliferação celular, síntese de esteroides e na expressão de receptores para o fator de crescimento epidermal (EGF); fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e LH (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Os receptores de FSH se enquadram na família de receptores acoplados a proteína G (COSTA, 2014). As proteínas Gs são heterotrímeras e intermediárias essenciais para o mecanismo de transdução de sinal na célula. Esse grupo de proteína possui uma estrutura comum constituída pelas sub-unidades α , β e γ , sendo formada por um domínio extracelular, transmembrana (composto por sete hélices hidrofóbicas) e outro intramembranário.

Os receptores que atuam por meio da proteína G, possuem 2 pólos: N-terminal extracelular e C-terminal intracelular. A interação hormônio-receptor se faz através da ligação do hormônio com a porção extracelular da proteína, que então, promove a ativação do terminal intracelular (COSTA, 2014; DE MOURA, 2011).

2.7. Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE)

A PIVE iniciou-se comercialmente no Brasil em 1998 e desde então vem se intensificando em diversos países (BUENO e BELTRAN, 2008; BÓ, CEDEÑO e MAPLETOFT, 2019). É uma importante biotecnologia que tem sido utilizada para maximizar a utilização de doadoras com elevado valor genético, no auxílio à reprodução de indivíduos com infertilidade adquirida e como base para a produção de clones, animais transgênicos e pesquisas com células-tronco. Além disso, é utilizada na experimentação, para o entendimento de eventos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial e na avaliação da eficiência de outras técnicas.

A PIVE envolve as etapas de coleta, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), sendo a maturação a etapa primordial para obtenção da eficácia na produção embionária. Entre as dificuldades dessa técnica está o custo elevado, em função à infra-estrutura laboratorial, à inconsistência dos resultados referentes à taxa de mórulas e blastocistos e o tempo de execução demandado, desde a punção até a evolução *in vitro* dos embriões (MIRANDA et al., 2007).

A maturação oocitária é o processo em que o oócito adquire a competência para a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Durante a MIV, os oócitos passam por diversas modificações nucleares e citoplasmáticas que os tornam capazes de serem fecundados e possíveis de gerar um embrião (GORDON, 2003). Dentre as alterações nucleares, se observam a quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico, e dentre as alterações citoplasmáticas: redistribuição das organelas intracelulares (mitocôndrias migram para posição perinuclear e grânulos corticais depositam-se abaixo da membrana vitelina) e a do mecanismo de liberação de cálcio (Ca^{2+}) (BARRETTO, 2007).

A FIV é a técnica laboratorial que realiza a união entre o gameta feminino (oócito) com o gameta masculino (espermatozoide) para a formação do zigoto, que evolui até o estágio de blastocisto (PALMA, 2008). Diversos laboratórios utilizam sêmen congelado, porém é de suma importância avaliar a procedência e qualidade do mesmo (VARAGO et al., 2008), uma vez que a variação individual dos touros é um dos principais fatores que interferem na fertilização e na PIVE (WATANABE et al., 1999; XU et al., 2006). Além disso, é ideal a utilização de meios de cultivo e condições laboratoriais adequadas para obtenção de sucesso na técnica. O processamento da

FIV é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 38,5°C, atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade a 95% (CORRÊA, 2006).

Na etapa de cultivo, ocorrem diversas divisões mitóticas nas células zigóticas até o embrião atingir o estágio de mórula. Nesse período ocorrem: ativação do genoma embrionário, divisão celular, compactação dos blastômeros, e início da distinção embrionária com a formação do blastocele (BUENO e BELTRAN, 2008; LIMA e SOUZA, 2009). Com a formação do blastocisto, as células se diferenciam formando a massa celular interna (MCI), que originará o feto, o trofotoderma (TF), que originará os anexos embrionários, e a cavidade chamada blastocele (GORDON, 2003). Para obter taxas satisfatórias de crescimento embrionário é fundamental se manter as condições mais próximas possíveis encontradas na tuba uterina, que é onde o oócito fertilizado inicia a sua evolução, até chegar à fase de embrião (LIMA e SOUSA, 2009). O pH, oxigênio, hormônios e nutrientes devem encontrar-se presentes nas mesmas quantidades ou em quantidades próximas ao observado *in vivo* (FIGUEIREDO, 2010; WRENZYCKI, 2016). O cultivo até o estágio de blastocisto expandido tem duração de 7 a 8 dias, a depender do meio utilizado.

3. HIPÓTESES

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do FSH, AMPc, hCG e as combinações durante a maturação oocitária *in vitro* e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados *in vitro* com suplementação de FSH, AMPc, hCG e as combinações;

- Avaliar a migração de grânulos corticais e de mitocôndrias no ooplasma ao final da MIV de oócitos bovinos em meio suplementado com FSH, AMPc, hCG e combinações;
- Quantificar o percentual de PIVE com oócitos bovinos maturados em meio suplementado com FSH, AMPc, hCG e combinações, e avaliar o teor lipídico dos mesmos.

ANTES DO OBJETIVO

A suplementação com FSH, AMPc e hCG, podem modular a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos e melhorar a competência na produção de embriões in vitro.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local do experimento

Os experimentos foram realizados durante o ano de 2019, no Laboratório de produção in vitro de embriões do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, em Jaboticabal, São Paulo.

5.2. Produtos

Produtos químicos e meios foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a menos que indicado de outra forma.

5.3. Preparo dos meios de maturação e lavagem dos oócitos

Inicialmente foram preparadas as soluções de FSH (500µg/mL de Folltropin-V, Bioniche, Belevile, Canadá) e AMPc (1000 µg/mL - D-0627), ambas foram

diluídas em 2 mL de PBS. A solução hCG (5.000 UI de Vetercor®, Intervet, São Paulo, SP, Brasil), diluída em 5 ml de PBS.

Para o meio de maturação dos oócitos foi preparado semanalmente o meio-base: meio TCM199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 25 mM de bicarbonato de sódio (S-6297), 60 mg de BSA (A8806); 1,0 µg/mL de ITS (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, U.K., I-1884); 1,0 µg/mL de suplemento antioxidante (Sigma-Aldrich - A1345); 83,4 mG/mL de sulfato de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 0,2 mM de piruvato de sódio. O meio suplementado com BSA foi utilizado para fazer três meios diferentes: meio FSH suplementado com 50 µg/mL da solução de FSH; meio AMPc suplementado com 100 µg/mL da solução de AMPc; o meio hCG suplementado com 100UI/mL da solução de hCG.

Para o meio de lavagem o meio-base: TCM199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 10 mM de bicarbonato de sódio (S-6297), 15 mM de hepes, mg de BSA (A8806) ou 10% de SFB (controle); 1,0 µg/mL de ITS (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, U.K., I-1884); 1,0 µg/mL de suplemento antioxidante (Sigma-Aldrich - A1345); 83,4 mG/mL de sulfato de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 0,2 mM de piruvato de sódio. De acordo com os tratamentos, foram acrescentados 50 µg/mL da solução de FSH ou 100 µg/mL da solução de AMPc ou UI/mL da solução hCG.

5.4. Colheita dos ovários, classificação e seleção dos oócitos

Os ovários foram obtidos semanalmente em abatedouro regional (Minerva de Barretos - São Paulo, Brasil), sendo acondicionados em garrafas térmicas e transportados ao laboratório a temperatura entre 33 e 36 °C.

No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina (36°C), e folículos entre 3mm e 8mm foram aspirados com o auxílio de agulhas (30x10mm – BD, Juiz de Fora, MG, Brasil) acopladas à seringas de 20 mL contendo 100 µl da solução FSH. O líquido folicular recuperado foi depositado em tubos cônicos de 50 mL. Após 15 minutos, o precipitado foi aspirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para uma placa de Petri (Corning, 100 x 15 mm). O sedimento foi avaliado, procedendo-se à seleção dos CCOs antes de serem colocados nos meios

de maturação. Os CCOs foram classificados em Grau I (GI), Grau II (GII), Grau III (GIII), desnudos e atrésicos, pelo número de camadas de células de *cumulus* e homogeneidade do citoplasma (Leibfried-LRutledge et al., 1987). Somente os CCOs classificados como grau I, II e III foram utilizados.

Os oócitos selecionados foram manipulados em meio de lavagem (3 gotas de μL cada) e transferidos (50 CCOs/grupo) para o meio de maturação. A maturação dos CCOs foi realizada em placas de 4 (quatro) fossas (500 μL de meio/fossa), na ausência de óleo mineral. As placas de maturação com os diferentes tratamentos foram devidamente identificadas e mantidas em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e umidade controlada por 24 horas. Após esse período, os oócitos foram avaliados de acordo com cada experimento ou submetidos à fecundação. Para cada experimento, foram realizadas 2 (duas) repetições.

5.5. Delineamento experimental

5.5.1. Pré-experimento – Determinação da concentração de FSH e AMPc

Inicialmente foram realizados testes piloto de dose-respostas para identificar a melhor concentração de FSH (Foltropin) (0,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AMPc (D-0627) (0,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para serem utilizadas na MIV. Os folículos de 3 a 8 mm foram aspirados com seringa de 10 mL já contendo FSH ou AMPc para a maior concentração a ser utilizada no meio de maturação. A procura e seleção dos oócitos foi mantido em meio de lavagem contendo FSH ou AMPc na maior concentração utilizada. A última passagem dos oócitos selecionados foram lavados no mesmo meio de MIV onde seriam incubados por 16 ou 24 horas para posterior verificação da evolução nuclear com 16 e 24 horas de cultivo.

5.5.2 Experimento

No grupo controle (T1) foi utilizado 10% de SFB (Cripion Industria Brasileira, Andradina, SP, Brasil) como suplemento do meio de maturação.

Com o suplemento BSA-FAF (A8806) foram formados 9 (nove) grupos experimentais utilizando 6mg/ml de BSA no meio de maturação e em 8 (oito) destes grupos também foi adicionado FSH (50µg/mL) ou AMPc (100µg/mL) ou hCG (100UI) (Figura 1), individualmente ou combinados nos tratamentos T2 a T9 como descrito a seguir:

T1 – Somente SFB (controle);

T2 – Meio suplementado com FSH;

T3 – Meio suplementado com AMPc;

T4 – Meio suplementado com hCG;

T5 – Meio composto de 50% FSH (25µg/mL) + 50% AMPc (50µg/mL);

T6 – Meio composto de 50% FSH (25µg/mL) + 50% hCG (50UI);

T7 – Meio composto de 50% AMPc (50µg/mL) + 50% hCG (50UI);

T8 – Meio Composto de 33,3% FSH (16,65µg/mL) + 33,3% AMPc (33,3µg/mL) + 33,4% hCG (33,4UI);

T9 – Meio composto de (50% FSH (25µg/mL) + 50% AMPc (50µg/mL)) nas 12 horas iniciais e trocado pelo meio hCG (100UI) nas 12 horas finais;

T10 – Somente BSA.

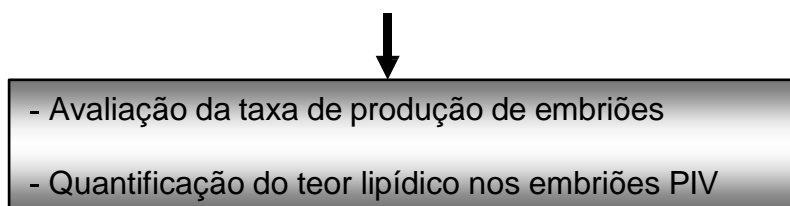


Figura 1: Esquema demonstrativo do delineamento experimental.

5.6. Avaliação da maturação nuclear

Para análise da maturação nuclear, os oócitos ao final da maturação foram transferidos para uma gota de 100 μL solução de 0,2% de hialuronidase (Hyalozima[®], Aspen), em PBS, e posteriormente lavados em três gotas de 100 μL de PBS/PVA (PBS livre de Ca^{+2} e álcool polivinílico 0.1%). A progressão meiótica foi avaliada pela coloração dos oócitos com 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de solução *Hoescht* (33342), ao abrigo da luz por 30 minutos. Posteriormente, os oócitos foram lavados novamente em PBS/PVA (3 gotas de 100 μL), colocados entre lâmina e lamínula de acordo com os grupos e observados em microscópio de epifluorescência (Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão) para avaliação da cromatina. Oócitos em MII e com presença do primeiro corpúsculo polar foram considerados maduros (C) em relação à avaliação do núcleo, enquanto os que se encontravam em outros estádios, foram considerados imaturos (A e B) (Figura 2).

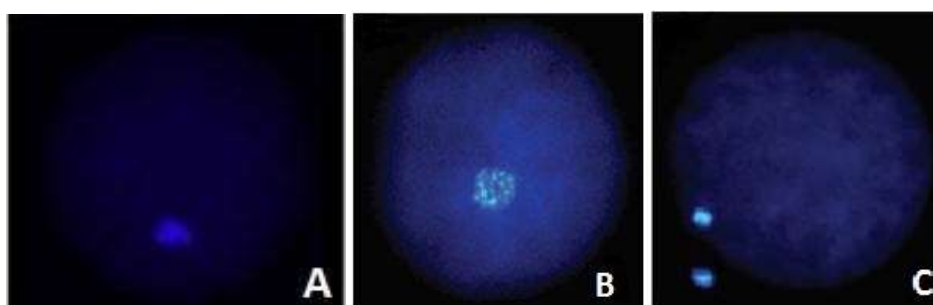


Figura 2: Fotomicrografias da progressão nuclear de oócitos bovinos. Oócito em estágio de vesícula germinativa – VG (A); oócito em metáfase I (MI) – (B) e oócito em metáfase II (MII) com extrusão do 1º corpúsculo polar – (C).

5.7. Avaliação da maturação citoplasmática por meio da marcação de grânulos corticais

Oócitos com adequada maturação citoplasmática apresentam os grânulos corticais distribuídos de forma periférica e justapostos a membrana plasmática do oócito. Sendo assim, os oócitos após os horários de MIV do experimento, foram lavados em PBS/PVA 0.1% e as células do *cumulus* removidas mecanicamente em solução de hialuronidase. Em seguida, os oócitos foram colocados em solução de Pronase E (P5147) - 0,5 % em PBS - para remoção da zona pelúcida e lavados em meio de lavagem por três vezes. Os oócitos sem zona pelúcida permaneceram em uma gota de 200 µl de meio de lavagem por 5 minutos, em seguida lavados em 200 µl de solução de bloqueio (PBS, 1.0 mg/ml de BSA, 100 nM de glicina e 0.2% de azida de sódio) por três vezes e fixados em 100 µl de paraformaldeído 3 % (P4168) à temperatura ambiente, por 30 minutos. Novamente, foram lavados em solução de bloqueio por três vezes (5 minutos/gota). Foram permeabilizados em solução de Triton X 0,1 % de PVA e novamente lavados em solução de bloqueio (três vezes/5 minutos cada). Posteriormente, foram incubados com lectina *Lens culinaris*-FITC 2,5 % (Vector – FL1041), a 37^o C, por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, foram lavados em 200 µl na solução de bloqueio (duas vezes/5 minutos cada) e montados entre lâmina e lamínula. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão). Oócitos com os grânulos corticais dispostos na periferia, formando um halo, foram considerados maduros (A), e oócitos com presença de “clusters” (C) ou em transição (B), imaturos (Figura 3).

Figura 3: Fotomicrografias ilustrando as categorias da distribuição de grânulos corticais no ooplasma após a MIV de oócitos bovinos. Os oócitos foram classificados em Periferia (A), Transição (B) ou Disperso (“Clusters”) (C).

5.8. Avaliação da maturação citoplasmática por meio da distribuição de mitocôndrias no ooplasma

Para a observação da distribuição das mitocôndrias, foi utilizado o marcador MitoTracker® RedCMXRos (Molecular Probes®, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) que possui a capacidade de se ligar às mitocôndrias ativas em células vivas.

Os oócitos foram desnudados por meio de seguidas pipetagens em gotas de solução de hialuronidase, lavados em meio PBS/PVA 0.1% e diretamente colocados em gotas de 100 µl da solução de MitoTracker (0,5 µM diluído em DMSO) por 30 minutos, a 37°C, no escuro. Em continuação, os oócitos foram lavados novamente em gotas de PBS/PVA 0.1%, e fixados em paraformaldeído 3%, por mais 30 minutos, ao abrigo de luz. Por fim, os oócitos foram postos em lâmina e lamínula para observação da distribuição de mitocôndrias através do microscópio de epifluorescência (Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão).

A fluorescência emitida pelas mitocôndrias ativas no citoplasma foi de coloração vermelha. Dessa forma, a distribuição mitocondrial foi classificada em três categorias: Periferia (A), quando as mitocôndrias se encontravam dispostas por toda a periferia do citoplasma; Transição (B) quando a maior parte das mitocôndrias esteve dispersa no citoplasma, mas uma pequena parte se dispôs na periferia; e Disperso (C) quando todas as mitocôndrias se encontravam difusas pelo citoplasma. Considera-se a categoria “periférica” para oócitos imaturos e “transição” e “disperso” para oócitos maduros (Del Collado et al., 2016) (Figura 4).

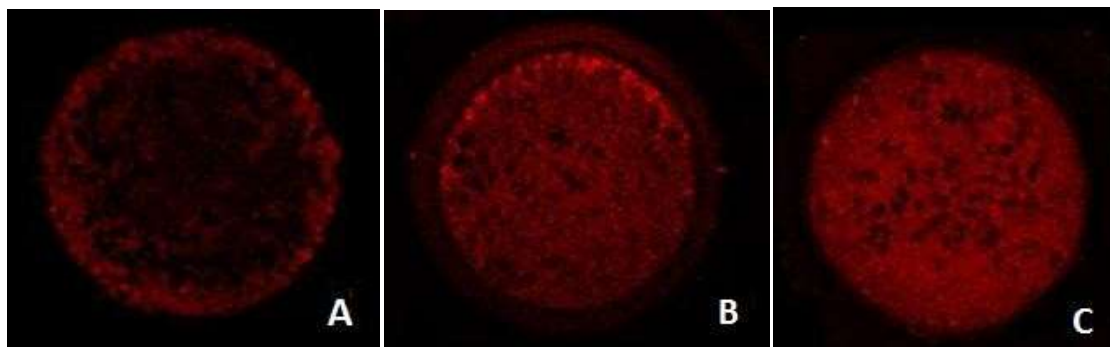


Figura 4. Fotomicrografias ilustrando as diferentes categorias da distribuição de mitocôndrias ativas no ooplasma após a MIV de oócitos bovinos. Os oócitos foram classificados em: Periferia (A), Transição (B) ou Disperso (C).

5.9. Produção *in vitro* de embriões bovinos

Após a MIV, oócitos dos diferentes grupos experimentais foram fertilizados *in vitro*. Foi utilizado sêmen congelado de uma mesma partida disponível no laboratório, previamente testado. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria à temperatura de 38°C por 30 segundos. O sêmen foi depositado sobre o gradiente de Percoll® a 45% e 90% de concentração, em temperatura ambiente e centrifugado a uma força de 3.250xG, durante 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento espermático resultante, adicionado 500µL do meio de fecundação e novamente centrifugado a uma força de 800xG, por 5 minutos. O sedimento resultante da segunda centrifugação foi previamente diluído em meio de fecundação. O meio de fecundação era composto por TALP-FIV; 6.0 mg/mL de BSA-FAF; 83.4 µg/mL de amicacina; 0.2 mM piruvato de sódio; 10 ug/mL de heparina, 18 mM de penicilamina, 10 uM de hipotaurina e 1.8 uM de epinefrina. A partir da segunda centrifugação foram retiradas duas amostras de 5 µl para determinar a motilidade progressiva e a concentração. O sêmen foi ajustado para 25X10³ espermatozoides por µL. Em todos os grupos experimentais a gota FIV foi ajustada para 100 µL contendo 100X10³ espermatozoides vivos.

Os oócitos maturados foram manipulados duas vezes em meio TL-Sêmen e uma vez em meio de fecundação e, por fim, transferidos para as gotas de fecundação, cobertas por óleo mineral estéril (Dow Corning Co., Midland, MI, EUA).

As placas então foram incubadas por 18 a 20 horas, a 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

Para o cultivo embrionário, os prováveis zigotos foram transferidos da placa de FIV para uma gota contendo 150 µL de meio TL-Sêmen para a remoção das células do *cumulus* remanescentes, por meio de pipetagens sucessivas. Após a remoção das células, os zigotos foram manipulados de duas a três vezes em meio SOFaaci (fluido sintético de oviduto acrescido de aminoácidos, citrato de sódio e myo-inositol). Em seguida, foram distribuídos em placas de 4 (quatro) fossas, contendo 500 µL de meio SOFaaci. As placas foram incubadas em atmosfera controlada de 5% de CO₂, na temperatura de 38,5C^o e umidade relativa de 99%, por sete dias. Ao final deste período foi realizada a contagem dos embriões e os mesmos, fixados em paraformoldeído a 3.0%, para posterior avaliação do conteúdo lipídico.

5.10. Quantificação lipídica nos embriões bovinos

Inicialmente foram preparadas duas soluções: I) 20 ml de solução estoque (0,07g do corante *Lipid Oil Red O* (MAK194) + 20 ml de isopropanol) e II) solução de trabalho (preparada na hora do experimento), contendo solução estoque (700 µL/ml) e água destilada (300 µL/ml). As estruturas foram imersas em solução de etanol 50% (etanol + água destilada) por 2 minutos. Em seguida, foram coradas em solução de trabalho (100 µL/grupo), por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a marcação, as estruturas foram lavadas rapidamente em 2 gotas de 100 µL de solução de etanol 50% e transferidas pra uma gota de 100 µL de água destilada. Por fim, foram montadas entre lâmina e lamínula e levados ao microscópio (Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão) para digitalizar as imagens e realizar a análise através de software, do programa Image J. O resultado da quantificação lipídica embrionária foi dado de acordo com a média da área lipídica por embrião e grupo.

5.11. Análise estatística

As taxas de maturação nuclear e citoplasmática (migração de grânulos corticais e mitocôndrias), assim como as taxas de desenvolvimento embrionário,

foram avaliadas mediante o teste Qui-Quadrado (X^2). A quantificação lipídica dos embriões foi avaliada pelo teste não paramétrico de Mann Whitney. Foi realizada análise de variância dos dados, ao nível de 5% de significância.

6. RESULTADOS

6.1 Pré-experimento

As concentrações de eleição de FSH e AMPc utilizadas foram baseadas nos melhores resultados de atraso da maturação nuclear dos testes-pilotos. Desse modo, a maior taxa percentual de oócitos que não retomaram a meiose (oócitos em MI) nos períodos de 16h e 24h de MIV foi observada nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ de FSH (54,55% e 35,71%, respectivamente) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de AMPc (88,46% e 24,00%, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1: Análise da progressão nuclear de oócitos bovinos para metáfase I (MI) e metáfase II (MII) com 16 e 24 horas de cultivo de maturação em meio suplementado com FSH ou AMPc, em diferentes concentrações.

Tratamentos	Tempo no cultivo de maturação					
	16 horas			24 horas		
[] FSH $\mu\text{g/mL}$	Total de oócitos	MI n. (%)	MII n. (%)	Total de oócitos	MI n. (%)	MII n. (%)
0,0	30	21 (70,00)	0 (0,00)	25	1 (4,00)	24 (96,00)
10	28	13 (46,43)	0 (0,00)	25	5 (20,00)	20 (80,00)
50	22	12 (54,55)	0 (0,00)	28	10 (35,71)	15 (64,29)
100	25	13 (52,00)	0 (0,00)	30	10 (33,33)	18 (66,67)
[] AMPc $\mu\text{g/mL}$	Total de oócitos	MI n. (%)	MII n. (%)	Total de oócitos	MI n. (%)	MII n. (%)
0,0	26	20 (76,92)	0 (0,00)	30	5 (16,67)	25 (83,33)
50	27	22 (81,48)	0 (0,00)	29	5 (17,24)	23 (82,76)
100	26	23 (88,46)	0 (0,00)	25	6 (24,00)	17 (76,00)
200	25	22 (88,00)	0 (0,00)	28	6 (21,43)	21 (78,57)

6.2. Análise da maturação nuclear

A avaliação da maturação nuclear (extrusão do primeiro corpúsculo polar) pós MIV de oócitos bovinos durante 24 horas em meio suplementado com SFB, apresenta maior taxa de maturação nuclear (74,26%) em relação aos meios suplementados com BSA ($p < 0,05$), com ou sem a adição de FSH, AMPc ou hCG e as combinações entre eles. O número de oócitos que atingiram a fase de MII nesses grupos experimentais tendo como fonte protéica o BSA foi inferior ao grupo com SFB (T2: 25,45%; T3: 20,00%; T4: 39,05%; T5: 22,00%; T6: 28,86%; T7: 21,05%; T8: 23,21%; T9: 27,27%; T10: 41,00%) (Tabela 2).

Tabela 2: Análise da progressão nuclear de oócitos bovinos, em 24h de MIV, de acordo com os grupos experimentais.

Tratamentos	Oócitos (n)	Maturação nuclear		
		Imaturos	Maturos (MII)	% Maturos
T1 SFB	101	26	75	74,26 ^a
T2 FSH	110	82	28	25,45 ^b
T3 AMPc	105	84	21	20,00 ^b
T4 hCG	105	64	41	39,05 ^b
T5 FSH+AMPc	100	78	22	22,00 ^b
T6 FSH+hCG	97	69	28	28,86 ^b
T7 AMPc+hCG	95	75	20	21,05 ^b
T8 FSH+AMPc+hCG	112	86	26	23,21 ^b
T9 (FSH+AMPc)+hCG	110	80	30	27,27 ^b
T10 BSA	100	59	41	41,00 ^b

^{a,b}. Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$, Qui-quadrado).

6.3. Análise da maturação citoplasmática por meio da marcação de grânulos corticais

Um dos parâmetros utilizados para avaliar a ocorrência da maturação citoplasmática pós MIV de oócitos bovinos foi a migração de grânulos corticais (GC)

no ooplasma. O grupo com SFB (T1: 59,09%) apresentou a maior taxa de migração dos grânulos corticais para a periferia ($p < 0,05$), diferindo de todos os grupos em que o BSA foi utilizado como fonte protéica, com ou sem a suplementação de FSH, AMPc ou hCG e as combinações entre eles, que não se diferiram entre si (T2: 23,47%; T3: 16,00%; T4: 22,00%; T5: 23,16%; T6: 14,74%; T7: 31,48%; T8: 33,64%; T9: 26,88%; T10: 36,00%). A migração dos GC considerados em transição teve maior frequência nos tratamentos onde a fonte protéica foi o BSA, em comparação ao grupo com SFB ($p < 0,05$). A maior taxa percentual de oócitos com GC nessa categoria foi observada em T3 (47,00%) e a menor, em T1 (18,18%). Em relação aos oócitos que apresentaram os GC em “clusters” dispersos no ooplasma, as menores taxas foram observadas no grupo com SFB (22,73%) e no tratamento com BSA e os três hormônios (T8: 23,64%), ($p < 0,05$), (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos submetidos à 24h de MIV, de acordo com os grupos experimentais:

Tratamentos	LOCALIZAÇÃO DOS GRANULOS CORTICAIS			
	Oócitos	Periferia ($p = 0,00$)	Transição ($p < 0,001$)	Disperso ($p = 0,0022$)
	<i>n</i> total	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
T1 SFB	110	65 (59,09) ^a	20 (18,18) ^c	25 (22,73) ^b
T2 FSH	98	23 (23,47) ^{bcd}	40 (40,82) ^a	35 (35,71) ^{ab}
T3 AMPc	100	16 (16,00) ^d	47 (47,00) ^a	37 (37,00) ^{ab}
T4 hCG	100	22 (22,00) ^{cd}	42 (42,00) ^a	36 (36,00) ^{ab}
T5 FSH+AMPc	95	22 (23,16) ^{bcd}	40 (42,11) ^a	33 (34,74) ^{ab}
T6 FSH+hCG	95	14 (14,74) ^d	43 (45,26) ^a	38 (40,00) ^a
T7 AMPc+hCG	108	34 (31,48) ^{bc}	46 (42,59) ^a	28 (25,93) ^{ab}
T8 FSH+AMPc+hCG	110	37 (33,64) ^{bcd}	47 (42,73) ^{ab}	26 (23,64) ^{ab}
T9 (FSH+AMPc)+hCG	93	25 (26,88) ^{bc}	33 (35,48) ^a	35 (37,63) ^b
T10 BSA	100	36 (36,00) ^b	25 (25,00) ^{bc}	39 (39,00) ^a

^{a,b,c,d} Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$, Qui-quadrado).

6.4. Análise da maturação citoplasmática por meio da distribuição de mitocôndrias no ooplasma

Outro método utilizado para análise da maturação citoplasmática foi a distribuição de mitocôndrias no ooplasma. A presença de mitocôndrias em “clusters” dispersos foi observada em 55,55 % ($p < 0,001$) dos oócitos maturados com SFB, sendo maior que todos os demais tratamentos experimentais onde o BSA foi utilizado ($p < 0,05$), com ou sem suplementos. Houve um aumento significativo de oócitos que apresentaram mitocôndrias na região periférica a partir do uso do BSA e/ou suplementos, em relação ao grupo com SFB (T1: 13,33% versus T10: 40,00%). Quanto à distribuição de mitocôndrias em transição no ooplasma, houve diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo que a maior ocorrência de maturação foi observada no grupo T7 (42,59 %) e a menor, no grupo T5 (30,49%) (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação da localização de mitocôndrias em oócitos bovinos submetidos à 24h de MIV, de acordo com os grupos experimentais:

Tratamentos	LOCALIZAÇÃO DAS MITOCONDRIAS			
	Oócitos	Periferia ($p < 0,001$)	Transição ($p < 0,001$)	Disperso ($p < 0,001$)
	<i>n</i> total	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
T1 SFB	90	12 (13,33) ^b	28 (31,11) ^{de}	50 (55,55) ^a
T2 FSH	98	30 (30,61) ^a	40 (40,82) ^{abc}	28 (28,57) ^b
T3 AMPc	95	35 (36,84) ^a	35 (36,84) ^{bcde}	25 (26,31) ^b
T4 hCG	95	33 (34,74) ^a	36 (37,89) ^{abcd}	26 (27,37) ^b
T5 FSH+AMPc	82	27 (32,93) ^a	25 (30,49) ^e	30 (36,58) ^b
T6 FSH+hCG	104	35 (33,65) ^a	43 (41,35) ^{ab}	26 (25,00) ^b
T7 AMPc+hCG	108	34 (31,48) ^a	46 (42,59) ^a	28 (25,92) ^b
T8 FSH+AMPc+hCG	100	37 (37,00) ^a	37 (37,00) ^{abcd}	26 (26,00) ^b
T9 (FSH+AMPc)+hCG	95	30 (31,58) ^a	37 (38,94) ^{abcd}	28 (29,47) ^b
T10 BSA	100	40 (40,00) ^a	35 (35,00) ^{bcde}	25 (25,00) ^b

^{a,b,c,d} Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$, Qui-quadrado).

6.5. Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE)

Na avaliação da influência das diferentes fontes protéicas e/ou suplementos durante a MIV sobre as taxas de PIVE, houve diferença entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). O grupo contendo SFB apresentou a maior taxa de produção embrionária (T1: 40,87%) em comparação a todos os grupos experimentais com BSA (Tabela 5). Entre os tratamentos com BSA e/ou suplementação hormonal, os grupos não se diferiram entre si, porém o tratamento que melhor demonstrou resultados na PIVE foi a utilização do BSA e os três hormônios juntos durante a MIV (T8: 33,64%).

Tabela 5: Resultado da produção embrionária *in vitro* a partir de oócitos bovinos maturados por 24 horas, de acordo com os grupos experimentais:

Tratamentos	Oócitos (n)	Estrutura ao final do cultivo		
		Degenerados	Embriões	% embriões
T1 SFB	115	94	47	40,87 ^a
T2 FSH	127	105	33	25,98 ^b
T3 AMPc	134	116	29	21,64 ^b
T4 hCG	151	108	35 ^b	23,18 ^b
T5 FSH+AMPc	149	109	41	27,52 ^b
T6 FSH+hCG	138	80	29	21,01 ^b
T7 AMPc+hCG	119	71	39	32,77 ^b
T8 FSH+AMPc+hCG	107	91	36	33,64 ^b
T9 (FSH+AMPc)+hCG	119	68	28	23,53 ^b
T10 BSA	289	208	81	28,03 ^b

^{a,b} Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$, Qui-quadrado).

6.6. Análise da quantificação lipídica dos embriões de PIV

O resultado da quantificação lipídica embrionária foi dado de acordo com a média da área lipídica por embrião e grupo. As diferentes fontes protéicas SFB e BSA e/ou suplementos utilizadas durante a MIV de oócitos bovinos não interferiram no acúmulo lipídico dos subsequentes blastocistos produzidos. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (Mann Whitney) (Tabela 6).

Tabela 6: Quantificação percentual da área lipídica dos embriões de PIV de acordo com os grupos experimentais:

Tratamentos	% média da área lipídica/embrião ("n" = 100 embriões/grupo)
T1 SFB	39,15 ^{bc}
T2 FSH	41,14 ^b
T3 AMPc	40,88 ^b
T4 hCG	34,04 ^{cd}
T5 FSH+AMPc	48,62 ^a
T6 FSH+hCG	33,14 ^{cd}
T7 AMPc+hCG	32,85 ^d
T8 FSH+AMPc+hCG	48,13 ^a
T9 (FSH+AMPc)+hCG	40,65 ^b
T10 BSA	34,63 ^{cd}

^{a,b,c,d} Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$, Mann Whitney).

7. DISCUSSÃO

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a influência dos reguladores de maturação FSH, AMPc e hCG, em diferentes combinações, na maturação oocitária *in vitro* e na produção *in vitro* de embriões bovinos. É compreendido que existe uma

falta de sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática em oócitos bovinos maturados *in vitro*, sendo este o fator principal de baixas taxas de produção embrionária, quando comparados ao que se encontra *in vivo*. Dessa forma, o uso de inibidores, suplementos ou reguladores da maturação vem sendo amplamente aplicado a fim de retardar a maturação nuclear, de forma que ela ocorra mais sincronizada com a maturação citoplasmática e, assim, melhorar as taxas de blastocistos produzidos *in vitro*, além de compreender melhor as etapas envolvidas nesse processo. Para isso, foi necessário fazer a análise da maturação nuclear, a partir da observação da extrusão do primeiro corpúsculo polar; analisar a maturação citoplasmática de acordo com a distribuição dos grânulos corticais e de mitocôndrias no ooplasma; fazer a análise da produção *in vitro* de embriões bovinos e, por fim, realizar a quantificação de gotas lipídicas no ooplasma dos embriões de PIVE.

Rotineiramente, as taxas de progressão meiótica e a migração de grânulos corticais são utilizados como indicadores de maturação nuclear e citoplasmática oocitária, respectivamente. No presente trabalho, todos os grupos experimentais em que o BSA foi utilizado, com ou sem suplementos, apresentaram taxas de maturação nuclear inferiores ao grupo com SFB ($p = 0.8194$). Acredita-se que o SFB é de suma importância para adequada maturação oocitária, tanto nuclear quanto citoplasmática, uma vez que devido aos seus compostos e fatores de crescimento, permite otimizar a expansão das células do *cumulus* (ABE E HOSHI, 2003). Além disso, é compreendido que o FSH e o AMPc são fatores bloqueadores da maturação e que a suplementação de FSH num meio de maturação oocitária, induz o aumento transitório do AMPc, o que pode culminar no bloqueio da retomada da meiose e a não ocorrência da maturação (RICHARDS, 1980).

Um estudo comparando o BSA e o SFB como fontes protéicas durante a MIV de oócitos bovinos, demonstrou que, quando o BSA foi utilizado sozinho, reduziram as taxas de oócitos em MII (com a extrusão do primeiro corpúsculo polar) e de oócitos com grânulos corticais na periferia (característica de oócitos maturados), quando comparados ao grupo com SFB (DEL COLLADO et al., 2016). Corroborando com tais resultados, o presente estudo demonstrou que, além de haver um retardo da maturação nuclear em todos os grupos em que o BSA foi utilizado, houve redução na migração de GC para a periferia, em relação aos oócitos expostos ao

SFB ($p < 0,05$). Essa diminuição na migração dos GC em oócitos maturados com BSA, foi observada igualmente por Avelino (2004).

Ali et al., 2012, também relataram redução na taxa de maturação nuclear em oócitos submetidos ao BSA como fonte protéica, assim como observado neste trabalho. Uma das explicações pode ser o efeito que os ácidos graxos presentes no SFB, possuem sobre a MIV (DEL COLLADO, 2016). Os lipídeos exercem papel importante durante a maturação nuclear a partir da relação entre a β -oxidação e a reativação da meiose (DOWNS et al., 2009 e DUNNING et al., 2010). É mediante ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que acontece a quebra da vesícula germinativa e a retomada da meiose (CHEN et al., 2006). De acordo com Downs et al., (2009), a principal enzima ativadora da MAPK é a acetil-CoA 48 carboxilase (ACC). Do mesmo modo que a oxidação dos ácidos graxos é uma das maiores consequências da ativação da MAPK devido à diminuição dos níveis do malonil-CoA, estudos demonstraram que a inibição da oxidação dos lipídeos impede, por sua vez, a reativação da meiose (DOWNS et al., 2009 e DUNNING et al., 2010). Assim, considerando que o BSA é uma fonte praticamente isenta de ácidos graxos, é justificável obter resultados inferiores de maturação nuclear nos oócitos submetidos a esse composto comparado ao uso do SFB.

Outro método utilizado como indicativo de maturação citoplasmática foi a distribuição das mitocôndrias ativas no ooplasma uma vez que a migração dessas organelas apresentam elevada importância durante a maturação *in vitro* de oócitos. Tendo conhecimento que não há síntese de novas organelas até a fase de blastocisto (DEL COLLADO et al., 2016), a oferta energética ao embrião até essa etapa, deve estar garantida e ser fornecida pelas mitocôndrias (VAN BLERKOM, 2011). Segundo Liu e colaboradores (2011), as mitocôndrias desempenham um importante papel em funções celulares como a motilidade, manutenção da homeostase celular e regulação da sobrevivência. Durante a maturação oocitária, as mitocôndrias deixam regiões periféricas dos oócitos e são redistribuídas ao longo do citoplasma para regiões de requerimento de ATP e de cálcio (SUN et al., 2006). A falha na redistribuição mitocondrial é sugestiva de maturação citoplasmática incompleta e está correlacionada a baixa competência para o desenvolvimento embrionário. Neste estudo, o grupo contendo SFB apresentou a melhor taxa de

mitocôndrias em “clusters” dispersos no citoplasma (indicativo de maturação) em comparação aos grupos com BSA e/ou suplementação hormonal, que demonstrou aumento na taxa de oócitos com mitocôndrias na periferia (oócito imaturo). Em 2008, Adona e colaboradores confirmaram esse relato com estudos onde o uso do SFB durante a MIV resultou, em quase totalidade, no aumento de mitocôndrias dispersas no ooplasma em relação ao uso do BSA. Corroborando com os resultados, Del Collado e colaboradores (2016), também demonstraram que o uso do SFB apresentou maior proporção de mitocôndrias em “clusters” dispersos distribuídos no ooplasma, quando comparado aos oócitos submetidos à MIV com BSA.

A distribuição de mitocôndrias já foi utilizada em diferentes espécies como um indicativo de maturação e de qualidade oocitária (SUN, 2006; NAGAI et al., 2006; LIU, 2011). LIU et al. (2011), avaliaram a distribuição das mitocôndrias de oócitos de mulheres após a maturação *in vitro* e *in vivo*. Segundo esses autores, dos oócitos maturados nuclearmente, somente 13,2% apresentavam distribuição difusa das mitocôndrias após a MIV; 75,5% apresentavam a distribuição de aspecto semiperiférico (transição); e apenas 11% apresentavam distribuição periférica. Porém, nos maturados *in vivo*, 80% destes apresentavam mitocôndrias distribuídas na região central do oócito, que é característica de citoplasmas maturados. Em relação aos bovinos, Del Collado e colaboradores (2016), compararam o comportamento mitocondrial na maturação *in vivo* e *in vitro* de oócitos bovinos, e relataram aumento na distribuição mitocondrial *in vivo*, comparada a atividade mitocondrial presente na MIV, e ainda ressaltou que, apesar das baixas taxas de maturação mitocondrial *in vitro*, o uso do SFB nesse processo, aumenta a disposição de mitocôndrias em “clusters” dispersos no ooplasma, em relação ao uso do BSA. Neste estudo, o grupo com SFB obteve resultado semelhante ao relatado por Del Collado et al., 2016, em que cerca de 30% dos oócitos maturados *in vitro*, apresentavam mitocôndrias em transição. Segundo os autores, é possível que os oócitos que não completaram a migração mitocondrial, mas encontram-se em transição, sejam capazes de manter níveis de β -oxidação razoáveis para atingir boas taxas de desenvolvimento. Os relatos sugerem que as mitocôndrias desempenham um papel importante durante o início desenvolvimento e que um

limiar mínimo de atividade regula a competência potencial para alcançar a etapa de blastocisto (TARAZONA et al., 2006).

Uma adequada β -oxidação depende de vários fatores, entre eles, da quantidade e localização lipídica e mitocondrial, da funcionalidade das mitocôndrias e de todos os fatores celulares que interferem nesse metabolismo. Apesar de existirem muitos estudos sobre a MIV, ainda é pouco elucidado o comportamento mitocondrial e de gotas lipídicas no ooplasma de oócitos e embriões bovinos. É compreendido que a MIV causa alterações na dinâmica mitocondrial e lipídica que podem acarretar em efeitos negativos no desenvolvimento dos oócitos e no acúmulo de lipídeos dos blastocistos. Assim como as mitocôndrias, os lipídeos representam uma importante fonte de energia por meio da β -oxidação e são estocados em gotas que são relocadas durante o processo maturacional. Essas estruturas tendem a migrar da periferia em direção ao núcleo como garantia da oferta energética. Acredita-se que a correlação lipídico-mitocondrial seja favorável a β -oxidação (DUNNING et al., 2014) e que a assincronia na migração dessas organelas observada durante a MIV, possa afetar o metabolismo oocitário devido a distância física entre as mesmas, provocando uma deficiência na β -oxidação (DEL COLLADO et al., 2016).

É compreendido que modulações nas concentrações de AMPc alteram o teor lipídico de oócitos bovinos e embora o acúmulo excessivo de lipídeos durante a PIVE venha a ser prejudicial aos embriões, produzindo embriões menos criotolerantes, a oxidação lipídica é de suma importância no fornecimento do suporte energético adequado para o desenvolvimento embrionário. O soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) são suplementos utilizados durante a PIVE, e contêm alto e baixo teor lipídico, respectivamente. Diante disso, diversos estudos relatam aumento lipídico em embriões de PIVE em que o SFB é utilizado, uma vez que o acúmulo lipídico pode ser resultado do transporte de lipídeos do meio de cultivo para o citoplasma do oócito (FERGUSON E LEESE, 1999, KIM et al., 2001, ABE et al., 2002, DEL COLLADO et al., 2016). Em contrapartida aos relatos encontrados na literatura, este trabalho demonstrou que mesmo na ausência do SFB, não houve redução do conteúdo lipídico dos embriões de PIVE, se assemelhando à média percentual de lipídeos presentes nos grupos com BSA. Del

Collado et al., 2016, também não relataram diferenças na quantidade lipídica dos embriões ao comparar as duas fontes protéicas durante a MIV.

De acordo com a taxa de produção embrionária *in vitro*, embora ainda existam diferenças frente às taxas de produção *in vivo*, a utilização do SFB foi fundamental para o aumento percentual da PIVE, em comparação a todos os grupos experimentais com BSA. Acredita-se que os ácidos graxos, presentes em maior quantidade no SFB e praticamente ausentes no BSA, permitam melhor fornecimento energético na fase de desenvolvimento e pré-implantação embrionária, aumentando as taxas de blastocistos e a qualidade dos embriões obtidos. Desse modo, o uso de SFB durante a MIV, pode fornecer mais lipídeos oocitários e a fonte energética desses embriões durante a CIV estaria assegurada, sem conseqüências de acúmulo lipídico embrionário (DEL COLLADO et al., 2016).

Por todo exposto, o atual estudo foi capaz de demonstrar que o BSA-FAF, com ou sem suplementos durante a MIV, nas diferentes combinações e concentrações utilizadas, apesar de promover maior retardo na maturação nuclear de oócitos bovinos, ainda não demonstra ser o meio ideal para substituição do SFB, uma vez que não foi capaz de proporcionar completa maturação das organelas e melhorar as taxas de produção embrionária, além de não reduzir a quantidade lipídica presente nos blastocistos em comparação aos embriões submetidos ao SFB. Apesar disso, entre os grupos de oócitos expostos ao BSA, a suplementação com os três hormônios juntos durante a MIV (FSH + AMPc + hCG), se torna uma importante ferramenta de estudos por demonstrar bons resultados na migração dos grânulos corticais e na taxa de produção embrionária *in vitro*.

8. CONCLUSÕES

- O uso dos reguladores de maturação FSH, AMPc e hCG em diferentes combinações e de acordo com as suas concentrações durante a MIV de oócitos bovinos, por 24 horas, na presença de BSA-FAF, permite o atraso da retomada da meiose e, conseqüentemente, retardo na ocorrência da maturação nuclear;

- A presença do SFB durante a MIV de oócitos bovinos melhora as taxas de migração de grânulos corticais e a distribuição de mitocôndrias no ooplasma, sendo ainda a melhor fonte protéica para a maturação citoplasmática comparado ao BSA-FAF;
- A substituição do SFB pelo BSA-FAF não melhora as taxas de produção *in vitro* de embriões, mesmo na presença dos reguladores de maturação durante a MIV por 24 horas;
- O uso do BSA-FAF no meio MIV não reduz os níveis lipídicos dos embriões produzidos *in vitro*, em relação ao SFB.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A., SIRARD, M. A. *Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during in vitro maturation. Biology of Reproduction*, v. 66, p. 901–905, 2002.

ABE H., HOSHI, H. *Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. Journal of Reproduction and Development*, v.49, p.193–202, 2003.

ADAMS, G. P., KOT, K., SMITH, C. A., GINTHER, O. J. *Selection of dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. Animal Reproduction Science*, v.30, p.259-271, 1992.

ADONA, P. R., PIRES, P. R. L., QUETGLAS, M. D., SCHWARZ, K. R. L., LEAL, C. L. V. *Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. Animal Reproduction Science*, v.108, p.48-65, 2008.

ALBUZ, F. K., SASSEVILLE, M., LANE, M., ARMSTRONG, D. T., THOMPSON, J. G.; GILCHIRST, R. B. *Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. Embryology*, v. 25, p. 2999-3011, 2010.

ANAS, M. K. I., SHOJO, A., SHIMADA, M., TERADA, T. *Effects of wortmannin on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation promoting factor and mitogen-activated protein kinase during bovine oocyte maturation in vitro. Theriogenology*, v. 53, p.1797-1806, 2000.

ANTONIOLLI, C. B. *Produção in vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária.. f. 32. Tese, Programa de Pós-Graduação em*

Ciências Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. 2005

BALISTA, P. A. Inibidores de fosfatidilinositol-2 cinase (PI3K) e neuroproteção mediada pela cascata de sinalização da AKT na fase aguda do modelo de pilocarpina. [Dissertação] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2010.

BARUSELLI, P. S., REIS, E. L., GONÇALVES, R. L., REVA, D. Manual Prático de Inseminação Artificial em Tempo Fixo, Curitiba: **Biogenesis do Brasil Ltda.**, 2004.

BILODEAU-GOESEELS, S. *Cows are not mice: the role of cyclic amp, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes.* **Molecular, reproduction and development.** v.78, p.734–743, 2011.

BÓ, A., CEDEÑO, A., MAPLETOFT, R. J. *Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle.* **Anim Reprod**, v.16, n.3, p.411-422, 2019.

BUENO, P. A., BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. Ver. Elet. Med. Vet., n. 11, p. 1-7, 2008.

CARNERO, A.; LACAL, J. C. *Wortmannin, an inhibitor of phosphatidyl-inositol 3-quinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway.* **FEBS Letters**, v. 422, p. 155-159, 1998.

CHEN, J., HUDSON, E., CHI, M. M., CHANG, A. S., MOLEY, K. H., HARDIE, D. G., DOWNS, S. M. *AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro.* **Developmental Biology**, v.291, p.227–238, 2006.

CIAPA, B., PHILIPPE, L. *Intracellular and Extracellular pH and Ca Are Bound to Control Mitosis in the Early Sea Urchin Embryo via ERK and MPF Activities.* **PLOS ONE**, v. 8, p. 66113-66120, 2013.

CONTI, M., BEAVO, J. *Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components of cyclic nucleotide signaling.* **Ann Rev Biochem**, v. 76, p. 481–511, 2007.

CORRÊA, G. A. Tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade de Brasília, Brasília – DF. 2006.

COSTA, S. L. DA; COSTA, E. P. DA; PEREIRA, E. C. M.; MENDES, V. R. DE A.; SILVA, T. F. DA; RODRIGUES, A. C. F.; FREITAS, P. P. T.; SANGLARD, L. M. P. Caracterização estrutural do hormônio folículo estimulante e seu papel na fisiologia de células ovarianas. **Ciência Animal**, v. 24(1), p. 11-23, 2014.

CROCOMO, L.; MARQUES FILHO, C.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F.; & DIMAS BICUDO, S. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18(4), p. 542-552, 2011.

CROCOMO, L.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F., & DIMAS BICUDO, S. Competência oocitária: importância e fatores determinantes *in vivo* e *in vitro*. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 13(1), p. 117-125, 2019.

DALL'ACQUA, P. C. Otimização Do Meio De Transporte De Oócitos Bovinos Destinados à Produção *in vitro* De Embriões. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2015.

DANIAL, N. N., GRAMM, C. F., SCORRANO, L., ZHANG, C. Y., KRAUSS, S., RANGER, A. M. & GYGI, S. *PBAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis*. **Nature**, 424(6951), p. 952, 2003.

DE MOURA, P. R., & VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica** (Porto Alegre), 21(1), p. 31-36, 2011.

DEL COLLADO, M., SARAIVA, N. Z., LOPES, F. L., GASPAS, R. C., PADILHA, L. C., COSTA, R. R., ROSSI, G. F., VANTINI, R., GARCIA, J. M. *Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos*. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 28, n.11, p.1721-1732, 2016.

DE RENSIS, F., LÓPEZ-GATIUS, F., GARCÍA-ISPIERTO, I., TECHAKUMPU, M. *Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: an update*. **Theriogenology**. May; 73 (8): 1001-8. Epub Feb 8. 2010.

DEKEL, N. *Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19–25. 2005.

DOWNS, S. M., MOSEY, J. L., AND KLINGER, J. (2009). *Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, p. 844–853, 2009.

DUNNING, K. R., CASHMAN, K., RUSSELL, D. L., THOMPSON, J. G., NORMAN, R. J., AND ROBKER, R. L. *Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development*. **Biology and Reproduction**, v. 83, p. 909–918, 2010.

FAN, H. Y., SUN, Q. Y. *Minireview: involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals*. **Biology and Reproduction**, v. 70, p. 535-547, 2004.

FARIN C. E., RODRIGUEZ, K. F., ALEXANDER, J. E, HOCKNEY, J. E, HERRICK ,JR, KENNEDY-STOSKOPF. *The role of transcription in EGF-and FSH-mediated oocyte maturation in vitro*. **Anim Reprod Sci**, v. 98, p. 97-112, 2007.

FERGUSON, E. M., LEESE, H. J. *Tryglyceride content of bovine oocyte and early embryos*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p. 373-378, 1999.

FERREIRA, E. M., VIREQUE, A. A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F. V., FERRIANI, R. A., NAVARRO, P. A. A. S. *Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence*. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. *Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (Bos taurus indicus) cattle*. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 2010.

GILBERT, I., ROBERT, C., DIELEMAN, S., BLONDIN, P., SIRARD, M. A. *Transcriptional effect of the LH surge in bovine granulose cells during the peri-ovulation period*. **Reproduction and fertility**, v. 141, p.193-205, 2011.

GILCHRIST, R.B; THOMPSON, J.G. *Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro*. **Theriogenology**, 67:6-15, 2007.

GINTHER, O. J., BERGFELT, D. R., KULICK, L. J., KOT, K. *Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle*.**Theriogenology**, v. 50, p. 507-519, 1998.

GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. 2^a ed. London: CABI Publishing, p. 548, 2003.

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, p. 82-94, 2009.

GULART, L. V. M. *Efeito do FSH adicionado aos meios definidos de maturação oocitária sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos*. Dissertação de mestrado em ciências médicas. Universidade de Brasília, 2009.

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

HUNZICKER-DUNN, M., MAIZELS, E. T., *FSH signaling pathways in immature granulose cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A*. **Cell Signal**, v. 18, p. 1351-1359, 2006.

IETS. *Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals*. *Embryo Transfer Newsletter*, 2019.

JOSEFSBERG, L. B., GALIANI, D., LAZAR, S., KAUFMAN, O., SEGER, R & DEKEL, N. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1282–1290, 2003.

KIM, J. Y., KINOSHITA, M., OHNISHI, M., FUKUI, Y. *Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matures bovine oocytes.* **Reproduction**, v.122, p.131-138, 2001.

KOVO, M., KANDLI-COHEN, M., BEN-HAIM, M. *An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes.* **Society for Reproduction and Fertility**, v. 132, p. 33-43, 2006.

KOYAMA, K., KANG, S., HUANG, W., YANAGAWA, Y., TAKAHASHI, Y., NAGANO, M. *Aging-related changes in in vitro matured bovine oocytes: Oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation.* **Journal of reproduction and development**. v.60, 2014.

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

LI, S., KANG, J., JIN, J., HONG, Y., ZHU, H. Y., JIN, L., GAO, Q., YAN, C., CUI, C., LI, W., YIN, X. *Effect of Demecolcine-Assisted Enucleation on the MPF Level and Cyclin B1 Distribution in Porcine Oocytes.* **PLOS ONE**, v.8, 2014.

LIANG, C. G., SU, Y. Q., FAN, H. F., SCHATTEN, H., SUN, Q. Y. *Mechanisms Regulating oocyte meiotic resumption: Roles of mitogen-activated protein kinase.* **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 2037–2055, 2007.

LIMA, I. M. T., SOUZA, A. L. *Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes.* **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.33, p.194-202, 2009.

LIU, M. *The biology and dynamics of mammalian cortical granules.* **Reproductive biology and endocrinology**, v. 9, p. 149, 2011.

LODDE, V., FRANCIOSI, F., TESSARO, I., MODINA, S. C., LUCIANO, A. M. *Role of gap junction-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**. v. 30, p. 1219-1226, 2013.

LONERGAN P., FAIR T. *In vitro-produced bovine embryos- Dealing with the warts.* **Theriogenology**, v. 69, p. 17-22, 2008.

MAO L., LOU, H., LOU, Y., NING, W., FAN, J. *Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation*. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, p. 284– 299, 2014.

MARQUES, M. G., MELLO, M. R. B., TAVARES, L. M. T., NICACIO, A. C., ASSUMPÇÃO, M. E. O. D., VISITIN, J. A. *Maturação e desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores de MPF*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 48, n. 6, p. 468- 477, 2011.

MEINECKE, B., JANAS, U., PODHAJSKY, E., MEINECKE-TILLMANN, S. *Histone H1 and MAP quinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition*. **ReprodDomestAnim**, v. 36, p. 183-188, 2001.

MIRANDA, M. S., CARVALHO, C. M. F., CORDEIRO, M. S., SANTOS, S. S. D., OHASHI, O. M. *Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção in vitro de embrião bovino*. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 31, n.2, p. 218- 223, 2007.

MOGOLLÓN-WALTERO, E. M., CALIXTO, C., VALE, D. F., PEREIRA, J. L., CURCIO, A. G., LOGULLO, C., DIAS, A. J. B., GOMES, H. F. *Sinalização por insulina durante a maturação in vitro de oócitos bovinos*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, p.12-20, 2013.

NABENISHI, H., TAKAGI, S., KAMATA, H., NISHIMOTO, T., MORITA, T., TSUZUKI, Y. *The Role of Mitochondrial Transition Pores on Bovine Oocyte Competence After Heat Stress, as Determined by Effects of Cyclosporin A*. **Molecular Reproduction and Development**. v.79, p. 31–40, 2012.

NAGAI, T. *The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes*. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2006.

NISHIMURA, T., FUJII, W., KANO, K., SUGIURA, K., NAITO, K. *Analyses of the Involvement of PKA Regulation Mechanism in Meiotic Incompetence of Porcine Growing Oocytes*. **Biology of reproduction**, v. 87, p. 1-8. 2012.

OLIVEIRA, E. G., POLISSENI, J., GUERRA, M. O., PETERS, V. M. *Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na ovogênese*. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, p. 29-33, 2009.

PALMA, G. A. *Producción in vitro de embriones bovinos*. In: **Biotecnología de la reproducción**. 2ª ed. Mar del Plata - Argentina, p 313-380, 2008.

PARK, M. R., GUPTA, M. K., LEE, H. R., DAS, C. Z., UHM, J. S., LEE, H. T. *Possible involvement of Class III phosphatidylinositol-3-quinase in meiotic progression of porcine oocytes beyond germinal vesicle stage*. **Theriogenology** v. 75, p. 940-950, 2011.

PAULINI, F., SILVA, R. C., RÔLO, J. L. P., LUCCI, C. M. *Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. Journal of Ovarian Research*, v. 7, p. 102, 2014.

PEREIRA, M. M., COSTA, F. Q., OLIVEIRA, A. P., SERAPIÃO, R. V., MACHADO, M. A., VIANA, J. H. M., CAMARGO, L. S. A. *Quantification of maternal transcripts in bovine oocytes under different maturation systems. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 6, p. 1394-1400, 2010.

PINTO, R. F. Efeitos do FGF10 na maturação oocitária e produção de embriões bovinos *in vitro*. Mestrado em Ciências Biológicas, Botucatu-SP. Universidade Estadual Paulista, 2012.

PINGUS, G., ENZMANN, E. V. *The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. the activation of ovarian eggs. The Journal of Experimental Medicine*, v. 62, p. 655-675, 1935.

RICHARDS, J. S. *Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. Physiol Ver*, v. 60, n.1, p. 51-89, 1980.

RIZOS, D. *Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. Biology of Reproduction*, v. 68, p. 236–243, doi:10.1095/biolreprod.102.007799, 2002.

ROMAR, R., COY, P., RATH, D. *Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes. Theriogenology*. v. 78, p.1126-1139, 2012.

SALHAB, M., TOSCA, L., CABAU, C., PAPILLIER, P., PERREAU, C., DUPONT, J., & UZBEKOVA, S. *Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. Theriogenology*, v. 75, n.1, p. 90-104, 2011.

SALHAB, M.; DHORNE-POLLET, S.; AUCLAIR, S.; GUYADER-JOLY, C. *In vitro Maturation of Oocytes Alters Gene Expression and Signaling Pathways in Bovine Cumulus Cells. Molecular Reproduction and development*. v. 80, p.116-182,. 2013.

SARAIVA, M. V. A., MATOS, M. H. T., FAUSTINO, L. R., CELESTINO, J. J. H., SILVA, J. R. V., & FIGUEIREDO, J. R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 4, p. 206-221, 2010.

SASSEVILLE, M.; ALBUZ, F. K.; CÔTÉ, N.; GUILLEMETTE, C.; GILCHRIST, R. B.; RICHARD, F. J. *Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. Biology of Reproduction*. v. 81, p. 415-425, 2009.

SIDDIQUI, M. A. R., GASTAL, E.L., JU, J.C., BEG, M. A., GINTHER, O. J. *Nuclear Configuration, Spindle Morphology and Cytoskeletal Organization of In Vivo Maturing Horse Oocytes*. **Reprod Dom Anim**, vol. 44, p. 435-440, 2009.

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

SIRARD, M., FLORMAN, H., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M., BARNES, F., SIMS, M., FIRST, N. *Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes*. **BiolReprod**, v. 40, p. 1257-1264, 2006.

SOMFAI, T., KIKUCHI, K., KANEDA, M., AKAGI, S., WATANABE, S., MIZUTANI, E., HARAGUCHI, S., DANG-NGUYEN, T. Q., INABA, Y., GESHI, M., NAGAI, T. *Cytoskeletal abnormalities in relation with meiotic competence and ageing in porcine and bovine oocytes during in vitro maturation*. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 40, p. 335-344, 2011.

STRICKER, S. *Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during maturation and fertilization*. **Seminars in cell and developmental biology**, v. 17, p. 303-313, 2006.

SUN, Q., SCHATTEN, H. *Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization*. **Reproduction**, v. 131, p. 193-205, 2006.

TARAZONA, A. M, RODRIGUEZ J. I, RESTREPO L. F, OLIVERA-ANGEL, M. *Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in Vitro*. **Reproduction-Physiology and Biotechnology**, University of Antioquia, Medellin, Colombia, 2006.

THOMAS, R. E., ARMSTRONG, D. T. & GILCHRIST, R. B. *Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels*. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 548-556, 2004.

VACCARI, S., HORNER, K., MEHLMANN, L., CONTI, M. *Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest*. **Dev Biol**, v. 316, p. 124-134, 2008.

VAN BLERKOM, J. *Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence*. **Mitochondrion**, v. 11, p. 797-813, 2011.

VAN DEN HURK, R., & ZHAO, J. *Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles*. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VARAGO, F. C., MENDONÇA, L. F., LAGARES, M. A. *Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução*. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 36, p. 100-109, 2008.

XU, J., GUO, Z., SU, L., NEDAMBALE, T. L., ZHANG, J., SCHENK, J., MORENO, J. F., DINNYES, A., JI, W., TIAN, X. C., YANG, X., DU, F. *Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm.* **J Dairy Sci.**, v. 89, p. 2510- 2518, 2006.

WADIA, P., KHOLKUTE, S., & NANDEDKAR, T. *Antifertility effect of an octapeptide, a fragment of FSH binding inhibitor, in the common marmoset (Callithrix jacchus).* **Contraception**, v. 67, n. 2, p. 151-160, 2003.

WATANABE, Y. F., WATANABE, M. R., DAYAN, A., VILA, R. A. *The effect of bull on OPU-IVP in zebu cattle.* Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 27, n.1, p. 297, 1999.

WATSON, A. J. *Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence.* **Journal of animal science**, v. 85, p. 432-435, 2007.

WEI, S., SHEN, X., LAI, L., LIANG, H., DENG, Y., GONG, Z., & CHE, T. *FSH receptor binding inhibitor impacts K-Ras and c-Myc of ovarian cancer and signal pathway.* **Oncotarget**, v. 9, n. 32, p. 22.498, 2018.

WHITAKER B. D, KNIGHT J. W. *Exogenous γ -glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos.* **Theriogenology**, v. 62, p. 311-322, 2004.

WRENZYCKI, C. *Sistemas de cultivo in vitro: quão longe estamos das condições ideais?* Anais. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, v. 30, p. 155-159, 2016.

WYMANN, M., MARONE, R. *Phosphoinositide 3-quinase in disease: timing, location, and scaffolding.* **Curr. Opin. Cell Biol.** PubMed. (2):141-9, apr, 2005.

ZHUANDI, G., HAOQIN, L., YINGYING, D., LUJU, L., SUOCHENG, W., YINGPAI, Z., YOU, Li. *FSH receptor binding inhibitor influences estrogen production, receptor expression and signal pathway during in vitro maturation of sheep COCs.* **Theriogenology**, v.101, p. 144-150, 2017.