



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DANIELLE BÁRBARA PEREIRA DE CASTRO

**EFEITO DA PRÉ-MATURAÇÃO COM MODULADORES DE ADENOSINA
MONOFOSFATO CÍCLICA (AMPC) NA COMPETÊNCIA DE OVÓCITOS BOVINOS.**

BRASÍLIA

2023

DANIELLE BÁRBARA PEREIRA DE CASTRO

**EFEITO DA PRÉ-MATURAÇÃO COM MODULADORES DE ADENOSINA
MONOFOSFATO CÍCLICA (AMPC) NA COMPETÊNCIA DE OVÓCITOS BOVINOS.**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis.

Coorientação: Dra. Margot Alves Nunes Dode.

BRASÍLIA

2023

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andrei Fidelis, pela oportunidade de realizar este trabalho de iniciação científica junto à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todo conhecimento compartilhado e por todo incentivo acadêmico e pessoal.

À Dra. Margot Dode, não apenas pela oportunidade de ter realizado meu trabalho de iniciação científica junto à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, mas por todo conhecimento teórico e prático na área de reprodução animal.

À Dra. Ligiane Leme e à Dra. Nayara Kussano por toda paciência e ensinamento teórico e prático no meu dia a dia na Embrapa, bem como pelas conversas, conselhos e desabafos, que me ajudaram muito.

À Hallya Beatriz, hoje mestranda, e à mestranda Carol Nicolás por me ajudarem tantas vezes a aspirar e a rastrear os ovócitos mais rápido quando os ovários chegavam muito tarde.

Ao Leonardo Siqueira por me acompanhar em alguns experimentos até tarde da noite e me dar suporte quando, durante esses experimentos, algo dava errado.

À equipe do Laboratório de Reprodução Animal/CENARGEN.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pela bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

Ovócitos utilizados para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) são imaturos e, quando removidos dos folículos, retomam automaticamente a meiose, o que leva a uma maturação nuclear precoce. Isso afeta a qualidade do ovócito e a sua capacidade de gerar embrião, reduzindo a eficiência da PIVE. O presente trabalho de iniciação científica teve como objetivo avaliar o efeito do uso dos moduladores de AMPc, IBMX e NPPC, como inibidores de maturação nuclear de ovócitos bovinos na pré-maturação *in vitro*, visando aumentar a produção de embriões. Complexos cumulus-ovócito (CCO's) obtidos de ovários de abatedouro foram distribuídos em 3 tratamentos nos quais permaneceram por 6 e 22 horas: MIV (controle); pré-maturação com IBMX (IBMX) e pré-maturação com NPPC (NPPC). A retenção da maturação foi determinada às 6 e 22 horas (h) pelo estágio da meiose por coloração com lacmoide. Posteriormente, os grupos foram submetidos à fecundação e ao cultivo *in vitro*. O desenvolvimento embrionário foi avaliado pela taxa de clivagem em D2, de blastocisto em D6 e D7 e de eclosão em D8. A mensuração dos CCO's submetidos aos tratamentos foi feita em 0h, 6h e 22h. Os dados foram analisados pelo Qui-quadrado. À 0h, todos os ovócitos encontraram-se em estágio de vesícula germinativa (VG), e às 6h o maior índice de retenção ($P < 0,05$) foi observada no grupo NPPC, que apresentou 96,9% dos ovócitos em VG. Já às 22h os grupos submetidos à retenção por IBMX e por NPPC apresentaram taxa de maturação nuclear menor ($P < 0,05$) do que o grupo controle, sendo de 67,2%, 65,6% e 83,8%, respectivamente. Para avaliação da produção de embriões, somente a pré-maturação por 6 horas foi utilizada. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos para nenhum dos parâmetros embrionários. Quanto à avaliação da expansão das células do cumulus (CC's), não houve diferença ($P < 0,05$) entre os grupos IBMX e NPPC. Concluiu-se que o uso de NPPC por 6 h durante a pré-maturação é capaz de inibir a retomada da meiose, mas o uso desse modulador na pré-maturação não afeta a produção *in vitro* de embriões bovinos. Por fim, nota-se a potencialidade, para pesquisas científicas, dessa ferramenta como melhoria na técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a necessidade de mais estudos e experimentos nesse sentido.

Palavras-chave: produção *in vitro* de embriões bovinos; agentes moduladores de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc); pré-maturação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
2.1. Ovogênese e foliculogênese	7
2.2. Maturação ovocitária	7
2.3. Competência ovocitária	9
2.4. Retenção meiótica	9
2.4.1. Mecanismos da retomada da meiose	10
2.5. Moduladores de AMPc e Pré-maturação	11
3. MÉTODO	12
3.1. Delineamento experimental	12
3.1.1. Experimento 1. Efeito do tempo de PMIV e do inibidor na maturação nuclear de ovócitos bovinos	13
3.1.2. Experimento 2. Efeito da PMIV com IBMX e NPPC na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	13
3.2. Recuperação e seleção dos ovócitos	14
3.3. Pré-maturação	14
3.4. Maturação <i>in vitro</i>	14
3.5. Avaliação da Maturação Nuclear	15
3.6. Avaliação da atividade das junções gap	16
3.7. Avaliação da expansão das células do cumulus	16
3.8. Seleção espermática e fecundação <i>in vitro</i>	16
3.9. Cultivo embrionário e avaliação dos embriões	17
3.10. Análise estatística	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) está entre as biotecnologias de maior destaque na pecuária nacional, uma vez que possibilita melhor proveito das fêmeas bovinas de alto valor genético e, dessa forma, permite, de forma mais célere, maior produção e disseminação de animais geneticamente superiores (BARRETA et. al, 2021).

O processo de maturação do ovócito está intimamente relacionada à sua competência em ser fecundado, se desenvolver e ser capaz de alcançar uma gestação a termo. Porém, quando esses ovócitos são removidos artificialmente, que é o que ocorre na PIVE, sofrem uma maturação nuclear antecipada que impede a maturação citoplasmática adequada, e, conseqüentemente, prejudica a evolução desses gametas e seu eventual desenvolvimento embrionário (ARMSTRONG et. al, 2004).

Diante dessa precocidade e dessa dessincronização entre a maturação nuclear e a citoplasmática, estudos sobre técnicas que permitam a sincronização entre essas duas maturações são necessários, a fim de se potencializar a taxa embrionária na PIVE (ARMSTRONG et. al, 2004; LE BEAUX, RICHARD E SIRARD, 2003).

Em altos níveis, a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) bloqueia a divisão meiótica por suprimir o fator promotor de maturação (MPF). De forma contrária, quando em baixas concentrações, ativa o MPF, que leva à retomada da divisão meiótica. Dessa forma, o AMPC desempenha importante função na regulação da maturação ovocitária em mamíferos (BILODEAU-GOESEELS, 2011; ANDERSEN et. al, 1998).

Pesquisas apontam que o uso de moduladores artificiais de AMPC intraovocitário leva à retenção meiótica, que possibilita a retenção em vesícula germinativa (VG) e, assim, permite que o ovócito tenha oportunidade de realizar sua maturação citoplasmática antes da nuclear, com a devida produção de RNA's mensageiros (RNAm's) e de proteínas importantes no seu desenvolvimento (CHAUBE et. al, 2010; GUIMARÃES, 2013).

Dessa forma, a utilização de moduladores de AMPC (inibidores da retomada da meiose) surge como forma de permitir a sincronização entre a maturação citoplasmática e a nuclear dos ovócitos utilizados na PIVE, sendo uma possível forma de melhoria na maturação ovocitária e, portanto, nas taxas de produção embrionária da PIVE (GUIMARÃES, 2013).

Nesse sentido, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito dos moduladores de AMPC na pré-maturação de ovócitos bovinos *in vitro* no que tange à retenção meiótica, à

integridade das junções GAP e à produção embrionária *in vitro*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Ovogênese e foliculogênese

A evolução do ovócito se dá desde a formação das células germinativas primordiais (CGP's) até o estágio de ovócito maduro, em que está preparado para ser fecundado (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). As CGP's, que são indiferenciadas, são as antecessoras dos ovócitos no processo de formação desses gametas. Tais estruturas são de origem extragonadal e durante o desenvolvimento embrionário, migram do saco vitelínico às cristas genitais, em que ocorre a colonização das gônadas mediante divisões mitóticas. Nas cristas genitais se diferem em ovogônias e continuam a se dividir por meio de mitose. Depois, há a formação de cordões sexuais, nos quais as ovogônias replicam seu material genético e ocorre o desenvolvimento dos ovócitos primários (DAVIDSON E STABENFELDT, 2021; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

O ovócito primário é armazenado no folículo ovariano, uma estrutura funcional, que promove um ambiente apropriado para o crescimento e a maturação desses gametas. Essa estrutura também é responsável pela síntese de hormônios, como a inibina e o estrógeno (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

De acordo com a presença ou não de antro, os folículos são classificados em folículos pré-antrais e folículos antrais, respectivamente em que não há e em que há antro. Há a subclassificação dos pré-antrais em primordiais, primários e secundários. Quanto aos folículos antrais, há os terciários e os pré-ovulatórios (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

As junções comunicantes (junções GAP) são formadas no decorrer da propagação e acoplamento das células da granulosa. Essas junções proporcionam a comunicação e transferência de precursores metabólicos, de nutrientes, de sinais meióticos – inibitórios ou não –, de moléculas entre as células do cumulus (CC's) e o ovócito (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

Os folículos pré-ovulatórios são formados por um ovócito secundário próximo à ovulação e caracteriza o último estágio da foliculogênese (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

2.2. Maturação ovocitária

In vivo, os ovócitos primários permanecem estacionados na fase de diplóteno da

prófase I (meiose I) nos folículos antrais até o momento do pico pré-ovulatório de LH em ovócitos completamente crescidos, encontrados nos folículos pré-ovulatórios, e com aptidão meiótica. Entre esse pico de LH e a ovulação, ocorrem vários eventos no núcleo e no citoplasma do ovócito, eventos esses que determinam o processo de maturação ovocitária (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

A maturação nuclear é a continuidade de eventos que ocorrem do estágio de VG do ovócito primário até o estágio de metáfase II (meiose II), mediada por diversos fatores, como substâncias extracelulares das células dos folículos, gonadotrofinas e hormônios esteroides (BLANCO et. al, 2011; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

O processo de retomada da meiose ocorre nas seguintes etapas: i) início da condensação cromossômica; ii) rompimento da VG, que permite o iii) alinhamento da placa metafásica da metáfase I. Ao final da primeira divisão meiótica, ocorre a iv) redução do número de cromossomos à metade, bem como há v) formação do primeiro corpúsculo polar. Entra-se na segunda divisão meiótica, em que ocorre a vi) formação da placa metafásica II, que caracteriza o ovócito secundário, em que permanece estacionado nesse estágio (LANDIM-ALVARENGA, 2017). A retomada e a conclusão da segunda divisão meiótica acontecem no caso de o ovócito ser fecundado ou de haver ativação partenogenética (KUBELKA et. al, 2000).

A maturação citoplasmática corresponde à reorganização de organelas e o armazenamento de RNAm's e de fatores de transcrição. Esses constituintes citoplasmáticos atuam no mecanismo geral de maturação, de fecundação e de desenvolvimento embrionário. Dessa maneira, esses elementos citoplasmáticos estão relacionados com a competência meiótica do ovócito e com a sua capacidade de ser fecundado (ADONA et. al, 2008; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Na retomada da divisão meiótica nos ovócitos bovinos, é observada uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação. Há aumento dos níveis de cálcio, degradação de AMPc e aumento no desempenho de proteínas quinases, em especial a proteína conhecida como fator de promoção da maturação (MPF) (GUIMARÃES, 2013; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

No que diz respeito ao AMPc, diversas análises apontam que, nos ovócitos bovinos, seus níveis intraovocitários estão relacionados com a modulação da retomada da divisão meiótica (BILODEAU E SIRARD, 1990; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

O MPF está diretamente envolvido no início da maturação nuclear ovocitária. Uma vez

ativado, tem a capacidade de fosforilar proteínas envolvidas no envelope nuclear, assim como na condensação de cromatina e na reorganização do citoesqueleto (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

2.3. Competência ovocitária

A competência ovocitária é definida como a potencialidade de um ovócito completar sua maturação (tanto nuclear quanto citoplasmática), ser fecundado, alcançar o estágio de blastocisto e o estágio de prole viva (DONNISON et. al, 2007).

Assim, a competência está relacionada ao crescimento folicular e às alterações ocorridas no núcleo e no citoplasma do gameta na fase final do desenvolvimento folicular e da maturação, em que ocorre uma cadeia de alterações estruturais e funcionais no ovócito e nas suas células do cumulus (CHAMBERS et. al, 2008; GUIMARÃES, 2013).

Durante a foliculogênese, em especial a etapa dos folículos pré-antrais, há também diferenciações no crescimento do ovócito (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005), bem como diferenciações citoplasmáticas, como, por exemplo: expressivo aumento no número de ribossomos e de mitocôndrias, dentre outras organelas celulares, e na síntese de proteínas e de RNAm's (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Essas diferenciações sustentam o desenvolvimento embrionário inicial, uma vez que as proteínas maternas são traduzidas de RNAm's gerados nesse momento (SANDRI, 2007).

Dessa forma, a qualidade e a competência ovocitária são determinadas conforme a sua capacidade de armazenar RNAm's, bem como com a sua eficiência na reativação dessas moléculas, que, ao longo da maturação, continuam quiescentes entre suas sínteses e o seu emprego no desenvolvimento embrionário antes da ativação do genoma embrionário (SANDRI, 2007).

Durante a ovogênese, os elementos sintetizados no citoplasma são de fundamental importância para a competência meiótica, fecundação e desenvolvimento embrionário. Se não houver uma correta sincronia entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática, poderá acarretar prejuízo na fecundação e, também, no desenvolvimento embrionário inicial (SANDRI, 2007).

2.4. Retenção meiótica

Assim que é aspirado do seu folículo, como ocorre em uma das etapas da PIVE, o

ovócito retoma sua divisão meiótica espontaneamente, ocorrendo a condensação dos cromossomos, que, por sua vez, resulta no imediato bloqueio da atividade de transcrição e em alterações nos padrões de novas sínteses proteicas. Como consequência, esse ovócito não sofre as diferenciações citoplasmáticas e sua competência é afetada (MARCHAL, et. al, 2000).

A fim de mimetizar a fase de diferenciação ovocitária que ocorre *in vivo* na técnica *in vitro*, pesquisam buscam formas de reter os ovócitos no estágio de VG, para permitir que ocorra a adequada maturação citoplasmática. Uma das alternativas é o uso de fármacos que interferem nos níveis de AMPc intracelular (MARCHAL, et. al, 2000), dado que esse segundo mensageiro, em alta concentração intraovocitária, exerce relevante função na manutenção da retenção meiótica em estágio de vesícula germinativa (diplóteno da prófase I) (CHAUBE et. al, 2010).

Essa concentração intraovocitária acontece a partir da transferência contínua de AMPc das CC's para o ovócito pelas junções GAP (CHAUBE et. al, 2010). O controle dessa concentração é acontece pela ação das enzimas Adenil ciclase (AC) e fosfodiesterase (PDE), que sintetiza e degrada o AMPc respectivamente (ANDERSEN et. al, 1998).

Os altos níveis de AMPc intraovocitário são regulados, *in vivo*, pela atividade da guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e pela ativação de receptores de proteína G estimulatória. É possível que ocorra essa mesma regulação *in vitro* a partir da inativação das enzimas fosfodiesterases que degradam o AMPc (CHAUBE et. al, 2010).

2.4.1. Mecanismos da retomada da meiose

Os altos níveis de AMPc intraovocitário leva ao acionamento da proteína quinase A (PKA), que atua na fosforilação das subunidades do pré-MPF (MPF inativado), mantendo-o inativado e, conseqüentemente, mantendo a retenção meiótica (CHAUBE et. al, 2010). Se desfosforilado, o MPF promove a condensação da cromatina, que leva à quebra da vesícula germinativa e à reorganização do citoplasma ovocitário, ocorrendo a retomada da divisão meiótica. Apenas com a queda na concentração intraovocitária de AMPc que essa desfosforilação ocorre (CHAUBE et. al, 2010; GUIMARÃES, 2013).

Assim, a retomada da meiose ocorre ou pela estimulação por parte das gonadotrofinas, em especial do hormônio luteinizante, ou pela retirada do gameta do seu ambiente folicular (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

2.5. Moduladores de AMPc e Pré-maturação

A maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos corresponde à aspiração de complexos cumulus-ovócitos (CCO's) dos folículos antrais e, depois, o seu cultivo em condições ideais, para que atinjam a metáfase II. Porém, de acordo com Gilchrist e Thompson (2007), poucos desses ovócitos apresentam potencial de desenvolvimento a termo.

Também segundo Gilchrist e Thompson (2007), dois pontos da MIV devem ser ressaltados: (i) os CCO's são aspirados de forma mecânica e perdem seu ambiente folicular, ambiente o qual age na inibição meiótica, conseqüentemente, retomam a divisão meiótica de forma espontânea; e (ii) comumente os CCO's são retirados de folículos antrais médios, que não puderam completar seu desenvolvimento, bem como seu respectivo ovócito, que também não sofreu a devida capacitação e que não apresenta todos os elementos necessários para sustentar o início da embriogênese.

Esses pontos explicam a dificuldade de desenvolvimento de embriões e fetos criados em laboratório quando comparados àqueles gerados de ovócitos maturados *in vivo*, o que demonstra a necessidade de mais estudos relacionados a melhoras na técnica de MIV (GILCHRIST E THOMPSON, 2007).

Dessa forma, a indução da retenção meiótica surge como estratégia de melhoria da competência dos ovócitos oriundos de aspiração, em que se disponibiliza um tempo para que essas estruturas sofram as diferenciações citoplasmáticas necessárias para a aquisição de competência. Ou seja, a retenção em VG permitira uma melhor sincronização entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática e, assim, uma adequada síntese de RNAm mensageiro materno e síntese proteica específica. Dado isso que a indução da retenção meiótica *in vitro* do ovócito em VG é uma plausível estratégia de melhoria do processo de MIV (LE BEAUX, RICHARD E SIRARD, 2003).

A retenção meiótica pode ocorrer a partir do uso de métodos fisiológicos, como a utilização de fluido folicular, monocamadas de células da granulosa ou da teca e hemisseções de folículos (BILODEAU-GOESEELS, 2012), ou a partir do uso de moléculas que agem sobre o pré-MPF ou que inibam a ação de fosfodiesterases (CAIXETA, 2016; GUIMARÃES, 2013).

Dentre as moléculas que podem ser utilizadas para a modulação de AMPc e, assim, para a retenção meiótica, pode-se mencionar o uso de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) e de cilostamida.

O NPPC é um agente natural sintetizado em especial pelas células da granulosa mural, que estimula a liberação de GMPc, pela sua atividade nas células do cumulus, que desencadeia, dessa forma, o bloqueio da fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3) intraovocitário, e assume um papel na retenção meiótica (ALBERTINI et. al, 2014).

O IBMX age de forma transitória a partir da inibição, não específica, da fosfodiesterase. A cilostamida funciona inibindo de forma específica a PDE3. De qualquer forma, ambas moléculas impossibilitaram a degradação de AMPc e, conseqüentemente, a retomada da divisão meiótica (ALBUZ et. al, 2010; ALVES et. al, 2019; GUIMARÃES, 2013; FIRST E SIRARD, 1988).

Junto ao método da retenção meiótica, há o uso de cultura de pré-maturação (PM), ou, também chamada de maturação em duas fases. Na primeira fase, PM, faz-se a suplementação do meio com inibidores da meiose e proporciona um tempo adicional para que o ovócito aspirado possa alcançar sua competência de desenvolvimento (ALBERTINI et. al, 2014; GUIMARÃES, 2013).

Dessa forma, a combinação dessas estratégias visa estimular o aumento dos níveis de AMPc intraovocitários, bem como nas CC's, simulando o que acontece nos CCO's *in vivo* (CAIXETA, 2016; GUIMARÃES, 2013).

3. MÉTODO

3.1. Delineamento experimental

O presente estudo avaliou a ação do NPPC e do IBMX, ambos moduladores de AMPc, na retenção meiótica de ovários bovinos. Dessa forma, objetivou permitir uma melhor maturação citoplasmática e, assim, uma melhor maturação ovocitária, visando melhorar a produção *in vitro* de embriões bovinos.

Para tanto, foram realizados dois experimentos. O experimento 1 avaliou a retenção meiótica: (i) em 0h (grupo controle), (ii) submetidos à MIV padrão (grupo MIV), e à pré-maturação suplementada com (iii) IBMX (grupo IBMX) e com (iv) NPPC (grupo NPPC) por 6 horas. Nesse primeiro momento também foi analisada a expansão das células do cumulus e a integridade das junções GAP. Após a coleta de dados acerca da eficácia dos moduladores de AMPc, procedeu-se ao experimento 2, que consistiu na avaliação da taxa embrionária dos ovócitos tratados, pelo mesmo período, com moduladores de AMPc submetidos à PIVE.

3.1.1. Experimento 1. Efeito do tempo de PMIV e do inibidor na maturação nuclear de ovócitos bovinos

O objetivo desse primeiro experimento foi avaliar a retenção meiótica, a expansão das células do cumulus e a integridade das junções GAP de ovócitos submetidos à pré-maturação com IBMX e com NPPC.

3.1.1.1. Avaliação da retenção meiótica

Foram avaliados quatro grupos: grupo controle, grupo MIV, grupo IBMX e grupo NPPC. Com exceção do grupo controle, todos foram submetidos aos seus respectivos meios em gotas cobertas com óleo mineral em placa de Petri, e cultivados em estufa (atmosfera 5% de CO₂ com umidade saturada e temperatura de 38,8°C) por 6 e 22 horas. Posteriormente, os respectivos ovócitos foram desnudados e fixados; e, após 48h, avaliados quanto ao estágio da meiose.

3.1.1.2. Avaliação da expansão das células do cumulus

Os grupos IBMX e NPPC foram avaliados quanto à expansão das células do cumulus, em que foram fotografados em 0h, 6h e 28h (6h de pré-MIV mais 22h de MIV).

3.1.1.3. Avaliação da integridade das junções GAP

Para tanto, foram avaliados grupos de 0h e grupos MIV, IBMX e NPPC após 6h cultivados em estufa nas mesmas condições das outras etapas.

3.1.2. Experimento 2. Efeito da PMIV com IBMX e NPPC na produção *in vitro* de embriões bovinos.

A fim de se avaliar a ação dos moduladores de AMPc no resultado da produção *in vitro* de embriões bovinos, os CCO's aspirados e selecionados foram submetidos a três tratamentos, dos quais: i) Tratamento MIV (grupo controle): meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal (LRA); ii) Tratamento IBMX (grupo IBMX): meio de pré-maturação suplementado com 500µM de IBMX; iii) Tratamento NPPC (grupo NPPC): meio de pré-maturação suplementado com 100µM de NPPC.

Todos os grupos seguiram o protocolo de PIVE DO LRA e foram avaliados quanto à taxa de clivagem em D2, de blastocisto em D6 e D7 e de eclosão em D8. Para avaliação da produção de embriões, somente a pré-maturação por 6 horas foi utilizada.

3.2. Recuperação e seleção dos ovócitos

Ovários de vacas mestiças foram coletados em abatedouro e foram transportados até o laboratório a temperatura de 30 a 35°C. Os CCO's foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com auxílio de bomba a vácuo, acoplada com escalpe de calibre 18 – G. O conteúdo folicular foi depositado em tubos de plástico e, após dez minutos, o sedimento foi colocado em placa de Petry contendo líquido folicular previamente centrifugado. Os CCO's foram selecionados conforme sua aparência, seu número de camadas de células do cumulus (CC's) e a homogeneidade do seu citoplasma, sendo que aqueles de grau 1 e de grau 2 foram selecionados. Os CCO's de grau 1 correspondem àqueles com várias camadas de CC's, com citoplasma homogêneo e com finas granulações. Já os de grau 2 correspondem àqueles com, no mínimo, cinco camadas completas de CC's, com citoplasma homogêneo, mas com pigmentações irregulares em pequenas áreas.

3.3. Pré-maturação

Após a seleção, os CCO's foram transferidos para o meio de pré-maturação e foram cultivados por um período de 6 ou 24 horas, quando então foram transferidos para o meio de maturação.

A pré-maturação foi realizada em gotas de 150µL, cobertas com óleo mineral siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING[®]), em estufa com atmosfera a 5% de CO₂, umidade saturada e temperatura de 38,5°C. A base do meio de pré-maturação consistia em: TCM-199 com sais de Earle's suplementado com 0,075mg/mL de amicacina, 0,2% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF), 0,68mM de L-glutamina, 1µM de piruvato de sódio, 0,1µM de cisteamina e 10⁻⁴ UI/mL de FSH recombinante. O meio de pré-maturação foi suplementado com 500µM de IBMX ou com 100µM de NPPC.

3.4. Maturação *in vitro*

Imediatamente após a pré-maturação, os CCO's foram transferidos para o meio de maturação que consistia em: TCM-199 com sais de Earle's suplementado com 0,075 mg/ml de amicacina, 10% de SFB, 1 µg/mL de L-glutamina e 0,1 UI/ml de Hormônio Folículo Estimulante – (FSH), em gotas de 150 µl com até 30 estruturas, cobertas com óleo mineral siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING[®]) e, maturados por 22h em estufa com atmosfera a 5% de CO₂, umidade saturada e temperatura de 38,8°C.

3.5. Avaliação da Maturação Nuclear

Para avaliação de maturação nuclear e de estágio de meiose, os ovócitos foram analisados em 0h e após às 6h e 22h de pré-maturação e de maturação, e, depois da retirada das células do cumulus, foram submetidos à solução de fixação (etanol e ácido acético na proporção de três para um) por, no mínimo, 48h.

Nos grupos de 0h e de 6h, as células do cumulus foram retiradas por constantes pipetagens utilizando-se o próprio líquido folicular (0h) ou o meio de pré-miv (6h). Para realizar o mesmo processo com o grupo de 22h, utilizou-se a solução de hialuronidase antes das sucessivas pipetagens.

Após as 48h, foi realizada a avaliação com a coloração lacmoide utilizando-se o microscópio Nikon Eclipse E200 (microscópio de contraste de fase).

O corante lacmoide foi preparado a partir da receita de 1 (um) grama de Lacmoide, 45 (quarenta e cinco) mililitros de ácido acético e 55 (cinquenta e cinco) mililitros de água destilada, resultando, após sua filtragem, em aproximadamente 100mL da solução do corante lacmoide.

Com o uso de uma pipeta de vidro acoplada ao bulbo e com o auxílio de uma lupa, os ovócitos fixados foram transferidos para uma lâmina, com o mínimo de líquido. Para serem vedados e lavados, foi usado uma lamínula com vaselina em duas extremidades opostas, a fim de protegê-los e de formar um sistema “corrente” posteriormente.

A primeira etapa para o processo de coloração foi a lavagem dos ovócitos fixados com a solução lacmoide: primeiro posicionou-se um papel absorvente em uma das extremidades, e, na outra, depositou a solução lacmoide, que formou o sistema “corrente” e todos os ovócitos foram banhados pelo corante. Após a ação do corante, os ovócitos foram lavados, utilizando-se a mesma técnica, com a solução de fixação.

As extremidades da lâmina foram secadas com o papel absorvente e as extremidades sem vaselina foram vedadas com esmalte. Por fim, as lâminas foram avaliadas no microscópicos e os estágios da meiose foram avaliados.

Os estágios da meiose foram classificados em vesícula germinativa (VG), vesícula germinativa rompida (VGBD), outros estágios (metáfase I, anáfase I ou telófase I) e em metáfase II (MII).

3.6. Avaliação da atividade das junções gap

Depois de 6h de pré-maturação e de maturação, os ovócitos foram corados com calceína-AM (1 μ M), para avaliação da integridade das junções GAP. Antes da coloração, as estruturas foram lavadas em solução de polivinilpirrolidona (PVP), para a retirada do excesso de meio pré-MIV e MIV.

Com o uso de placa de 6 poços, pipeta de vidro acoplada ao bulbo e lupa, os ovócitos foram transferidos para uma gota de 100 μ L de calceína-AM (1 μ L de calceína-AM em 99 μ L de PVP) coberta com óleo mineral, onde permaneceram por 15 minutos. Após esse período, foram transferidos para uma gota de 100 μ L de PVP, também coberta por óleo mineral, onde permaneceram por 25 minutos. Depois, por sucessivas pipetagens, as estruturas foram desnudadas e lavadas em três gotas de banho de PVP. Por fim, foram transferidas para as lâminas e vedadas com lamínula e vaselina, para avaliação no microscópio Axiophoto e no programa Axiovision.

3.7. Avaliação da expansão das células do cumulus

Durante o processo de pré-maturação e de maturação, dos grupos IBMX e NPPC, para a produção *in vitro* de embriões bovinos, foram tiradas fotos dos CCO's em 0h, 6h (pré-maturação) e 22h (maturação) com a Nikon (Nikon Digital Sight DS-L3), e suas expansões foram mensuradas no programa ImageJ.

Para a determinação da média da expansão das células do cumulus, foi realizada a diferença entre as médias da mencionada expansão antes e depois da pré-maturação, bem como antes e depois da MIV.

3.8. Seleção espermática e fecundação *in vitro*

Antes de se iniciar o processo de seleção espermática, o meio FEC final foi preparado, o qual é composto por meio FEC, heparina e PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina), e o foi estabilizado em estufa.

Para seleção espermática foi utilizado o gradiente de Percoll de 45% e de 90% e o meio de capacitação (CAP), ambos preparados e mantidos em estufa a 38,8 $^{\circ}$ C, 5% de CO₂ até o momento do uso.

Quanto ao preparo do sêmen, primeiro descongelou-se a palheta de sêmen no descongelador de sêmen e de embriões trivolt – WTA[®], a 36 $^{\circ}$ C por 30 a 60 segundos.

Uma vez descongelado, depositou-se uma gota do sêmen na lâmina e, com um microscópio, avaliou-se motilidade e vigor (0-100 e 0-5). Nos casos em que os resultados foram de no mínimo, respectivamente, 30 e 2, prosseguiu-se com o protocolo. Nos casos em que os resultados foram menores, descongelou-se outra palheta de sêmen e repetiu-se a avaliação.

Posteriormente, depositou-se lentamente o sêmen descongelado sobre a coluna de Percoll e o centrifugou a 9.000 rpm por 5 minutos. Findada a centrifugação, o pellet formado foi retirado com cuidado e ressuspendido em 1mL de CAP e novamente centrifugado nas mesmas condições.

Retirou-se o sobrenadante e, a depender do tamanho do pellete formado, adicionou-se aproximadamente 100µL de FEC final (para mais ou para menos).

Para contagem da concentração espermática na câmara de Neubauer, e assim para o cálculo da dose inseminante, utilizou-se um micro tubo Eppendorff® para diluição de 5µL do sêmen ressuspendido em meio FEC final em 95µL de água.

Também após o processo de preparação do sêmen, avaliou-se novamente a motilidade e o vigor do sêmen. Para alcançar 100% de motilidade a partir dessa última avaliação, acrescentou-se a diferença ao volume da dose inseminante.

Assim, a dose inseminante foi dada como o volume da gota de fecundação sobre a concentração espermática mais a soma da porcentagem faltante para 100% de motilidade.

Os ovócitos foram transferidos para suas respectivas gotas de meio de fecundação, cobertas com óleo mineral, e, com a dose inseminante calculada, realizou-se a fecundação dessas gotas. Depois foram co-cultivados (ovócitos e espermatozoides) em estufa (atmosfera 5% de CO₂ com umidade saturada e temperatura de 38,8°C) por 18 a 20 horas.

O dia da inseminação das gotas foi considerado como D0.

3.9. Cultivo embrionário e avaliação dos embriões

Após as 18-20 horas, os prováveis zigotos foram levemente pipetados, a fim de se remover eventuais espermatozoides ali presentes, e transferidos para o meio de "synthetic oviductal fluid" (SOF), meio este de cultivo composto por fluido sintético de oviduto, soro fetal bovino (5%), myo-inositol (2,77mM), sodium tri citrato (0,34mM) e aminoácidos não essenciais e essenciais. Todas as estruturas permaneceram sob as mesmas condições de ambiente das outras etapas.

Após 48 horas do momento da FIV (D2), avaliou-se a clivagem e, no D6, D7 e D8 (pós FIV), avaliou-se o desenvolvimento e a taxa de blastocistos.

3.10. Análise estatística

Os dados de cada grupo referentes à retenção meiótica, à expansão das células do cumulus e à produção embrionária foram analisado pelo teste de Chi-quadrado, com 5% de significância ($p = 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se observa na tabela 1, foi realizada a avaliação, a partir da coloração com lacmoide, da retenção da maturação nuclear dos ovócitos submetidos a moduladores de AMPc. Os grupos foram submetidos a três tratamentos, nos quais permaneceram, para tal avaliação, por 6 e 22 horas: MIV (controle); pré-maturação com IBMX (IBMX) e pré-maturação com NPPC (NPPC).

Na maturação *in vitro*, o completo rompimento da vesícula germinativa ocorre aproximadamente após 6 horas e o estágio de metáfase II é alcançado, em média, após 19 a 21 horas (BORGES et. al, 2022; DONAHUE, 1968; HUANG et. al, 2021).

Todos os ovócitos avaliados a 0 hora encontraram-se em estágio de vesícula germinativa (VG), e, às 6 horas, o maior índice de retenção ($P < 0,05$) foi observada no grupo NPPC, que apresentou 96,9% dos ovócitos em VG. Esse resultado foi compatível com os estudos de Caixeta (2016) e de Paramio, Soto-Heras e Thompson (2019), que observaram, em média, 80% dos ovócitos retidos em VG nos grupos tratados com NPPC por 6 horas na PMIV.

Às 22 horas, os grupos submetidos à retenção por IBMX e por NPPC apresentaram taxa de maturação nuclear menor ($P < 0,05$) do que o grupo controle, sendo de 67,2%, 65,6% e 83,8%, respectivamente. Tal dado foi compatível ao dado observado por Guimarães (2013) ao avaliar maturação nuclear de ovócitos bovinos cultivados em PMIV com cilostamida, diferente de Caixeta (2016), que não observou diferença entre o grupo PMIV e o grupo controle.

Tabela 1. Avaliação dos estágios da meiose em ovócitos bovinos pré-maturados (PM) ou não (MIV) submetidos à 100 μ M de NPPC e à 500 μ M de IBMX por 6 e 22 horas.

Tratamentos	Número ovócitos	VG (%)	VGBD e outros estágios (%)	MII (%)
0h	60	60 (100) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a
6h MIV	67	54 (80,60) ^b	13 (19,40) ^b	0 (0) ^a
6h IBMX	64	57 (89,06) ^{bc}	7 (10,94) ^{bc}	0 (0) ^a
6h NPPC	64	62 (96,88) ^{ac}	2 (3,13) ^{ac}	0 (0) ^a
22h MIV	62	0 (0) ^d	10 (16,13) ^d	52 (83,87) ^b
22h IBMX	64	0 (0) ^d	21 (32,81) ^e	43 (67,19) ^c
22h NPPC	61	0 (0) ^d	21 (34,43) ^e	40 (65,57) ^c

a, b, c, d, e Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Dados analisados pelo teste chi-quadrado. VG = vesícula germinativa, VGBD = vesícula germinativa rompida, outros estágios = metáfase I, anáfase I ou telófase I, MII = metáfase II.

Posteriormente, os grupos foram avaliados no que tange à produção *in vitro* embrionária (Tabela 2), submetidos à fecundação e ao cultivo *in vitro*, em que os parâmetros de avaliação foram a taxa de clivagem em D2, de blastocisto em D6 e D7 e de eclosão em D8.

Para avaliação da produção de embriões, somente a pré-maturação por 6 horas foi utilizada. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos para nenhum dos parâmetros embrionários, observação compatível aos estudos realizados por Caixeta (2016), Paramio, Soto-Heras e Thompson (2019) e Huang et. al (2014).

Em ambas as avaliações, o grupo controle foi o MIV, meio de maturação *in vitro*,

Tabela 2. Produção embrionária de ovócitos bovinos pré-maturados (PM) submetidos à 100 μ M de NPPC e à 500 μ M de IBMX por 6 horas.

Grupo	Número ovócitos	Clivagem D2 (%)	Blastocistos D6 (%)	Blastocistos D7 (%)	Blastocistos D8 (%)
Controle	144	109 (75,7)	18 (12,5)	45 (31,3)	44 (30,6)
IBMX	134	102 (76,1)	15 (11,2)	37 (27,6)	42 (31,3)
NPPC	140	111 (79,3)	22 (15,7)	44 (31,4)	51 (36,4)

Dados analisados pelo teste chi-quadrado ($P < 0,05$).

uma vez que é o tratamento padrão de rotina utilizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen (LRA), em que uma manipulação tem, em média, a porcentagem de produção de embriões de 35%.

Para avaliação da expansão das células do cumulus (Tabela 3), os grupos IBMX e NPPC foram avaliados em 0h, antes de serem submetidos aos modulares de AMPc, em 6h de pré-maturação em seus respectivos tratamentos e, por fim, em 22h no meio de maturação padrão do LRA.

Tabela 3. Mensuração da área das CCOs em 0h (sem tratamento), em 6h de pré-maturação com IBMX e NPPC e em 22h de maturação *in vitro*.

Grupo	Número ovócitos	Média da área CCOs em 0h	Média da área CCOs em 6h	Média da área CCOs em 22h
IBMX	188	0,157	0,143	0,411
NPPC	187	0,150	0,140	0,314

Dados analisados pelo teste chi-quadrado ($P < 0,05$).

Não houve alteração antes e após a pré-maturação, o que já era esperado, uma vez que o uso dos moduladores de AMPc visa inibir a retomada da divisão meiótica e permitir uma melhor sincronização entre a maturação citoplasmática e a nuclear (LE BEAUX, RICHARD E SIRARD, 2003).

Quanto à avaliação antes e depois da MIV, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) na média da expansão das células do cumulus entre os grupos pré-maturados. Apesar de ser possível replicar *in vitro* o processo de expansão das CC's, a avaliação por si só da expansão não é suficiente para definir o status da maturação ovocitária e sua competência (CAIXETA E DODE, 2010). Não foi utilizado o grupo MIV padrão para controle.

Por fim, a comunicação, via JG, entre o ovócito e as células do cumulus influencia diretamente o processo de retomada da meiose. Era previsto nesse estudo avaliar a integridade das junções GAP, em associação com a expansão das células do cumulus, dos grupos tratados com IBMX e com NPPC, o que não foi possível, uma vez que os dados obtidos em relação à avaliação dessas junções pela coloração com calceína-AM não foram suficientes para publicação. Além do atraso da entrega do reagente, ocorreram problemas operacionais com o microscópio Axiophoto que impossibilitaram a realização adequada dessa etapa do experimento.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que o uso de NPPC por 6 horas durante a pré-maturação *in vitro* é capaz de inibir a retomada da meiose, o que não foi observado no uso do IBMX. Apesar de o NPPC ter capacidade de retenção meiótica, o uso desse modulador e do IBMX na pré-maturação não afeta a produção *in vitro* de embriões bovinos. Dessa forma, observa-se que o uso de moduladores de AMPc é uma técnica que necessita de mais estudos para a análise da sua funcionalidade e viabilidade na PIVE.

REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R.; LEAL, C. L.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Anim Reprod Sci.**, [s. l.], v. 108, p. 49-65, out. 2008. DOI 10.1016/j.anireprosci.2007.07.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17692479/>. Acesso em: 07 junho 2023.
- ALBERTINI, D. F.; CANTO, M. D.; COTICCHIO, G.; FADINI, R.; FRANCIOSI, F.; LODDE, V.; LUCIANO, A. M.; MODINA, S. C.; RENZINI, M. M.; TESSARO, I. Natriuretic Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, [s. l.], v. 91, p. 1-9, jul. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25078681/>. Acesso em: 03 outubro 2022.
- ALBUZ, F. K.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; SASSEVILLE, M.; THOMPSON, J. G. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Hum Reprod.**, [s. l.], v. 25, p. 2999-3011, dez. 2010. DOI 10.1093/humrep/deq246. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20870682/>. Acesso em: 31 maio 2022.
- ALVES B.G., CORREIA H.H.V., FIGUEIREDO J.R., MIELGO C.M., PAES V.M., RODRIGUES A.P.R., SILVA J.R.V., VIEIRA L.A., WHEELER M.B. Cilostamide affects in a concentration and exposure time-dependent manner the viability and the kinetics of in vitro maturation of caprine and bovine oocytes. **Res Vet Sci.** 2019 Feb; 122:22-28. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.002. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30448391.
- ANDERSEN, C. B.; CONTI, M.; RICHARD, F. J.; SHITSUKAWA, K.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 9-14, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9922093/>. Acesso em: 01 junho 2023.
- ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R.B.; THOMAS, R. E.; THOMPSON, J. G. Effect of Specific Phosphodiesterase Isoenzyme Inhibitors During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Meiotic and Developmental Capacity. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, Reston, v. 71, p. 1142–1149, jun. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15189837/>. Acesso em: 03 outubro 2022.
- BARRETA, M. H.; GASPERIN, B. G.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; RISSI, V. B.; SUDANO, M. J. Produção in Vitro de Embriões. In: FIGUEIREDO, J. R.; GASPERIN, B. G.; GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal e à humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2021. p. 249-296.
- BILODEAU, S.; SIRARD, M. A. Granulosa Cells Inhibit the Resumption of Meiosis in Bovine Oocytes In Vitro. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, Ontario, v. 43, p. 777-783, jun. 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1963317/>. Acesso em: 05 julho 2023.
- 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 & Development**, v. 78, p. 734–743, mai. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21688336/>. Acesso em: 27 novembro 2022.

BLANCO, M. R.; DEMYDA, S.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO, E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 7, p. 155-165, set. 2011. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-full-text-pdf/F83296011816.pdf>. Acesso em: 08 julho 2023.

BORGES, A. M.; et. al. Dynamics of nuclear and cytoplasm maturation of bovine oocytes cultivated in vitro in medium supplemented with fulerol. **Veterinary Medicine and Technology and Inspection of Animal Products**: Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v. 74, ed. 6, nov./dez. 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/NqzJzdRnHy5YGBXNRChznYD/?lang=en>. Acesso em: 6 ago. 2023.

CAIXETA, E. S.; DODE, M. A. N. AVALIAÇÕES DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS. **Veterinária e Zootecnia**. v. 17, ed. 1, p. 8-18, mar. 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/882843/1/document-8.pdf>. Acesso: 13 outubro 2022.

CAIXETA, F. M. C. **BLOQUEIO MEIÓTICO COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES CLONE POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**. 2016. 73 p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, BRASÍLIA, 2016. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/21047/1/2016_FelipeManoelCostaCaixeta.pdf. Acesso em: 13 outubro 2022.

CHAMBERS, E. L.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; PICTON, H. M. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, Winchester, v. 136, p. 703-715, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074213/>. Acesso em: 05 setembro 2022.

CHAUBE, S. K.; KUMAR, K. V. P.; TRIPATHI, A. Meiotic Cell Cycle Arrest in Mammalian Oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, Varanasi, v. 223, ed. 3, p. 592-600, jun. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20232297/>. Acesso em: 6 maio 2023.

DAVIDSON, A. P.; STABENFELDT, G. H. Desenvolvimento do sistema reprodutivo e diferenciação sexual. In: KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: GEN | Grupo Editorial Nacional S.A., 2021. p. 437-443.

DONAHUE, R. P. Maturation of the mouse oocyte in vitro. I. Sequence and timing of nuclear progression. **J. Exp. Zool.**, v. 169, ed. 2, p. 237-249, out. 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5750655/>. Acesso em: 1 ago. 2023.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L.; SISCO, B.; SOMERS, J.; SMITH, C. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocytes. **ScienceDirect**, New Zealand, v. 68, p. 84-90, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17467046/>. Acesso em: 07 junho 2023.

FIRST, N. L.; SIRARD, M. A. In Vitro Inhibition of Oocyte Nuclear Maturation in the Bovine. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 39, p. 229-234, set. 1988. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/39/2/229/2763589>. Acesso em: 7 outubro 2022.

FREUDZON, M.; JAFFE, L. A.; KE, H.; KRALL, J.; MEHLMANN, L. M.; MOVSESIAN, M. A.; NORRIS,

R. P.; RATZAN, W. J.; WANG, H. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, p. 1869-1878, jun. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19429786/>. Acesso em: 07 junho 2023.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, [s. l.], v. 67, p. 6-15, jan. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17092551/>. Acesso em: 6 maio 2023.

GUIMARÃES, A. L. S. **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO PARA AUMENTAR A COMPETÊNCIA DE OVÓCITOS BOVINOS**. Orientador: MARGOT ALVES NUNES DODE. 2013. 84 p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, BRASÍLIA, 2013.

GUSMÃO, A. O. M.; MEDEIROS, M. O.; SILVA, A. R. A BIOTECNOLOGIA E OS AVANÇOS DA SOCIEDADE. **Biodiversidade**, Rondonópolis. v. 16, ed. 1, p. 135-154, 2017. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/4979>. Acesso em: 26 abr. 2023.

HUANG, B.; et. al. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring. **Reproductive Biology and Endocrinology**, dez. 2021. Disponível em: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-021-00868-0>. Acesso em: 19 jul. 2023.

HUANG, W.; et. al., Prematurational Culture with 3-Isobutyl-1-methylxanthine Synchronizes Meiotic Progression of the Germinal Vesicle Stage and Improves Nuclear Maturation and Embryonic Development in *In Vitro*-grown Bovine Oocytes. **J. Reprod. Dev.** v. 60. ed. 1, p. 9-13, fev. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3963293/>. Acesso em: 18 jul. 2023.

KUBELKA, M.; MOTLÍK, J.; SCHULTZ, R. M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 62, p. 292-302, 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/62/2/292/2734558>. Acesso em: 3 maio 2023

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Fecundação e Clivagem. *In*: LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PRESTES, N. C. **Obstetrícia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 1-16. ISBN 978-85-277-3098-3.

LE BEAUX, G.; RICHARD, F. J.; SIRARD, M. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, p. 1049–1058, dez. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12935845/>. Acesso em: 27 abr. 2023.

MARCHAL, R.; MEIJER, L.; MERMILLOD, P.; TOMANEK, M. High Developmental Competence of Cattle Oocytes Maintained at the Germinal Vesicle Stage for 24 Hours in Culture by Specific Inhibition of MPF Kinase Activity. **Mol Reprod Dev.** v. 55, p. 89-95, jan. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10602278/>. Acesso em: 6 maio 2023.

REECE, W. O. Reprodução Feminina dos Mamíferos. *In*: REECE, W. O. *et al.* **Dukes | Fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. Parte 9 - Endocrinologia, Reprodução e Lactação, p. 651-673. ISBN 978-85-277-3135-5.

SANDRI, L. R. **Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultra-estrutura de oócitos e sua consequência na produção de embriões in vitro**. 57 p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA) - Faculdade de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, SANTA MARIA, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/10231>. Acesso em: 01 junho 2023.

SOUZA, L. C. B. **PIVE E IATF APLICADAS À REPRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE**. 2020. Trabalho Conclusão do Curso (Bacharel em Zootecnia) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2020. Disponível em: <https://repositorio.pucgoias.edu.br/jspui/bitstream/123456789/517/1/TCC%20LAZARA%20CAROLINY%20BARROS%20DE%20SOUZA.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2023.

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, abr. 2005. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15763114/>. Acesso em: 01 junho 2023.