

DANIELLE BÁRBARA PEREIRA DE CASTRO

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

**BRASÍLIA
2022**

DANIELLE BÁRBARA PEREIRA DE CASTRO

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

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências da
Educação e Saúde para a obtenção do
grau de bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Andrei Antonioni
Guedes Fidelis.

**BRASÍLIA
2022**

DANIELLE BÁRBARA PEREIRA DE CASTRO

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

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências da
Educação e Saúde para a obtenção do
grau de bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Andrei Antonioni
Guedes Fidelis.

Brasília, _____ de _____ de 2022.

Banca examinadora

Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis (Orientador/CEUB)

Prof. Dra. Fernanda Mulinari Fontana (Examinador interno/CEUB)

Dra. Taynan Stonoga Kawamoto (Examinador externo/EMBRAPA)

Dedico este trabalho aos meus pais, Gaspar e Ronilda; à minha avó, Rita Gomes; ao meu irmão, Gaspar Júnior; e, em especial, ao meu noivo, Lucas Pereira, – essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devo tudo o que sou.

Aos meus pais, Gaspar e Ronilda, e à minha avó, Rita Gomes, por serem meus maiores exemplos de força e de determinação.

De forma especial, à minha mãe e à minha avó, mulheres fortes e corajosas que sempre encararam seus obstáculos de cabeça erguida. Espero um dia conseguir ser pelo menos metade do que elas são.

Ao meu noivo, Lucas Pereira, que foi e é o meu maior incentivador. Só nós dois sabemos o quanto a decisão de uma segunda graduação foi difícil para mim e eu não teria tido essa coragem sem o seu apoio.

Ao meu irmão, Gaspar Júnior, que, apesar de nossas diferenças, sempre demonstra incentivo à sua maneira.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andrei Fidelis, por todo conhecimento compartilhado e por todo incentivo acadêmico e pessoal. Exemplo de profissional que me espelho diariamente.

À Dra. Margot Dode, não apenas pela oportunidade de estar realizando um projeto de pesquisa junto à Embrapa Recursos Genéticos, mas por todo conhecimento teórico e prático na área de reprodução animal.

À Dra. Ligiane Leme e à doutoranda 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 ajudam muito.

Aos meus amigos, Nadine, Clarice, Brendda, Juliana, André, Lucas, Helena, Adriana e Beatriz, que já caminham ao meu lado há uns bons anos e que sempre me deram apoio e palavras de incentivo. Vocês são os irmãos que a vida me deu.

Às minhas amigas Brunna e Brenda. Eu não poderia ter escolhido pessoas melhores para estarem junto comigo nessa intensa jornada que é a Medicina Veterinária.

"A lagarta não precisa de um milagre para virar borboleta. Ela precisa de um processo!"

(Tiago Brunet)

RESUMO

A pecuária nacional tem exigido cada vez mais melhorias nas técnicas de reprodução assistida (TRA's), buscando o incremento de melhoramento genético e o aumento na eficiência reprodutiva do rebanho. Hoje, um dos principais gargalos na produção *in vitro* de embriões bovinos é a maturação nuclear precoce dos ovócitos aspirados, que reflete negativamente no desenvolvimento desses gametas e, conseqüentemente, no posterior desenvolvimento embrionário. A presente revisão bibliográfica teve como objetivo realizar uma revisão prévia da fisiologia desses gametas e levantar dados científicos de diferentes autores acerca da utilização de moduladores de AMPc como hipótese de melhoria na competência ovocitária e no desenvolvimento embrionário de ovócitos utilizados na PIVE. Para tanto, abrangeu-se sobre o uso de: peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), isobutil-1-metilxantina (IBMX), Butirolactona I, Forskolin (FSK) e Cilostamida. Determinados autores observaram que uso de NPPC e de Butirolactona I levou à retenção meiótica, mas não notaram melhoras na taxa de desenvolvimento embrionário com esses tratamentos. O uso de IBMX associado ao NPPC resultou em retenção meiótica e os respectivos pesquisadores observaram melhora no desenvolvimento embrionário. Estudos com o uso de cilostamida verificaram que houve baixa retenção meiótica e que não houve diferença na produção embrionária. Experimentos com o uso de Forskolin associado ao IBMX apresentaram divergência entre alguns autores, em que uns constaram que houve melhora no desenvolvimento embrionário e outros comprovaram que não houve diferença significativa. Ademais, explanou-se o sistema de maturação ovocitária fisiológica simulada (SPOM), que se apresenta como uma revolucionária técnica de maturação ovocitária artificial, mas que outros laboratórios ainda não conseguiram replicar.

Palavras-chave: Biotecnologia, produção *in vitro* de embriões bovinos, ovogênese, *in vitro*, monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), agentes moduladores de AMPc.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
1. OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.....	10
2. MATURAÇÃO OVOCITÁRIA	11
3. COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA	13
4. RETENÇÃO MEIÓTICA.....	14
4.1. Mecanismos da retomada da meiose.....	15
5. MODULADORES DE AMP_c E PRÉ-MATURAÇÃO	16
5.1. Produção embrionária com a pré-maturação.....	17
5.1.1. <i>Pré-maturação suplementada com NPPC e IBMX</i>	17
5.1.2. <i>Pré-maturação suplementada com Butirolactona I</i>	19
5.1.3. <i>Pré-maturação suplementada com Forskolin e IBMX</i>	19
5.1.4. <i>Pré-maturação suplementada com Cilostamida</i>	21
6. SISTEMA DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA FISIOLÓGICA SIMULADA – SISTEMA SPOM.....	22
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

INTRODUÇÃO

O uso de biotecnologias é cada vez mais notado na pecuária nacional, como, por exemplo, na reprodução e na seleção genética animal, visando, principalmente, aumentar a eficiência reprodutiva de animais de alto valor genético e o número de seus descendentes (GUSMÃO, MEDEIROS E SILVA, 2017; SOUZA, 2020).

Entre as biotecnologias atualmente utilizadas na pecuária bovina, destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que permite melhor proveito de gametas e, assim, possibilita maior produção e disseminação, de forma mais célere, de animais com maior valor genético (BARRETA et. al, 2021).

Dentre as etapas da mencionada técnica, a maturação ovocitária está intimamente relacionada à competência do gameta em ser fecundado, se desenvolver e ser capaz de levar uma gestação a termo. No entanto, a remoção artificial dos ovócitos leva a uma maturação nuclear precoce, que ocorre antes da sua completa maturação citoplasmática, comprometendo o potencial desenvolvimento desses gametas e, posteriormente, o desenvolvimento embrionário (ARMSTRONG et. al, 2004).

Dessa forma, são necessários estudos sobre estratégias que sincronizem a maturação geral desses ovócitos, sem afetar sua qualidade, a fim de se maximizar a taxa embrionária nas produções *in vitro* (LE BEAUX, RICHARD E SIRARD, 2003). Para tanto, têm-se buscado alternativas que possibilitem a retenção desses gametas em vesícula germinativa (VG) (ARMSTRONG et. al, 2004; LE BEAUX, RICHARD E SIRARD, 2003).

O AMPc exerce papel fundamental na regulação da maturação dos ovócitos em mamíferos, o qual age como um regulador negativo, dado que, em altos níveis, bloqueia a progressão meiótica pela supressão do fator promotor de maturação (MPF) e, em baixas concentrações, ativa o MPF, levando à retomada da meiose (BILODEAU-GOESEELS, 2011; ANDERSEN et. al, 1998).

Estudos mostram que a modulação artificial de AMPc intraovocitário, em que há a sua alta concentração, leva à retenção meiótica, a qual permite que, durante essa retenção em VG, o ovócito tenha tempo hábil de realizar sua maturação citoplasmática, com a devida síntese de RNA's mensageiros (RNAm's) e de proteínas importantes no seu desenvolvimento (CHAUBE et. al, 2010; GUIMARÃES, 2013).

Portanto, a utilização de inibidores da retomada da meiose pela modulação do AMPc surge como meio de possibilitar a sincronização entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática de ovócitos submetidos à PIVE, sendo alternativa de se preparar o ovócito para sua completa maturação e, conseqüentemente, de se desenvolver melhor nas demais fases da citada biotécnica (GUIMARÃES, 2013).

Diante da necessidade de estudos sobre novas estratégias na melhoria da produção *in vitro* de embriões bovinos, o objetivo da presente revisão bibliográfica é realizar um levantamento acerca do uso e dos tipos de moduladores de AMPc como ferramenta de retenção meiótica e de possível melhoria na maturação ovocitária.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

O desenvolvimento do ovócito se dá desde a formação das células germinativas primordiais (CGP's) até o estágio de ovócito maduro, momento em que está apto a ser fecundado (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Ainda, de acordo com esses autores, a formação do ovócito ocorre basicamente em sete etapas: formação das CGP's; migração e colonização dessas estruturas nas gônadas femininas; diferenciação das CGP's em ovogônias e proliferação destas estruturas; início da meiose e parada da divisão meiótica no estágio de diplóteno da prófase I (ovócito primário). Nas fêmeas mamíferas, os ovócitos primários são constituídos ainda na fase embrionária e permanecem nesse estágio até a puberdade (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Dessa forma, as CGP's, indiferenciadas, são as precursoras dos ovócitos na ovogênese. Tais células são de origem extragonadal e migram, no decorrer da evolução embrionária, do saco vitelínico às cristas genitais, realizando a colonização das gônadas por divisões mitóticas. Uma vez nas cristas genitais, elas se diferem em ovogônias e permanecem se multiplicando por mitose. Posteriormente, há a formação de cordões sexuais, onde as ovogônias replicam seu material genético, com início da meiose I, e há a formação dos ovócitos primários (DAVIDSON E STABENFELDT, 2021; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Cada ovócito primário é armazenado em uma estrutura funcional chamada de folículo ovariano, cuja principal função é a de promover um adequado ambiente para o devido crescimento e maturação desses ovócitos. Ademais, o folículo também é responsável pela produção de hormônios, como, por exemplo, o estrógeno e a inibina (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Os folículos ovarianos são classificados, conforme a presença ou não do antro, em: folículos pré-antrais (ausência de antro) e folículos antrais (presença de antro). Os pré-antrais, por sua vez, são subclassificados em: primordiais, primários e secundários, conforme o seu estágio. Os folículos antrais incluem os folículos terciários e os pré-ovulatórios (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Nesse sentido, os primeiros folículos formados na foliculogênese são os folículos primordiais, os quais apresentam um ovócito primário envolvido por camada única de células achatadas, da pré-granulosa, e são considerados como o reservatório

de gametas femininos na vida reprodutiva da fêmea, por permanecerem em estágio de quiescência. Ainda, os folículos primários apresentam um ovócito, em crescimento, envolvido por uma camada de células cuboides, da granulosa, e com início da formação da zona pelúcida. Em contrapartida, os folículos secundários apresentam um ovócito totalmente envolvido pela zona pelúcida e por duas ou mais camadas de células cúbicas, da granulosa. Essas duas categorias de folículos são tidas como folículos em estágio inicial (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

A formação das junções comunicantes (*gap junctions* – GAP) ocorre durante a proliferação e acoplamento das células da granulosa, as quais favorecem a comunicação e transferência entre o ovócito e as células do cumulus de nutrientes, de precursores metabólicos, de moléculas e de sinais meióticos – inibitórios ou não – (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

Uma vez formado o antro (cavidade antral com líquido folicular), os folículos passam a ser classificados como folículos terciários – dominantes ou subordinados – e, posteriormente, em pré-ovulatórios, os quais apresentam um ovócito envolvido pelas seguintes estruturas: zona pelúcida, *corona radiata*, células do cumulus, células foliculares, antro, membrana basal e duas camadas de células da teca (teca interna e teca externa). Os folículos pré-ovulatórios, diferente dos terciários, são compostos por um ovócito secundário próximo à ovulação, caracterizando-se o último estágio da foliculogênese (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Além do mais, Reece (2017) explana que a constituição de folículos pré-ovulatórios é hormônio-dependente e por isso se inicia apenas com a puberdade, em que há níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) aumentados e diminuídos durante o ciclo estral.

2. MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

Como já explanado anteriormente, os ovócitos permanecem estacionados na fase de diplóteno da prófase I (meiose I) nos folículos antrais. A retomada da divisão meiótica, *in vivo*, ocorre com o pico pré-ovulatório de LH em ovócitos totalmente crescidos, presentes nos folículos pré-ovulatórios, e com competência meiótica. Entre o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação, acontecem diversos eventos tanto no núcleo quanto no citoplasma do ovócito, caracterizando-se o processo de maturação ovocitária (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

Dessa forma, a maturação nuclear é definida como a sucessão de eventos que acontece desde o estágio de vesícula germinativa (VG) do ovócito primário até o estágio de metáfase II da meiose II, intermediada por fatores extracelulares das células dos folículos, gonadotrofinas e hormônios esteroides (BLANCO et. al, 2011; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

A retomada da meiose ocorre com o começo da condensação cromossômica e consequente rompimento da VG, a qual permite o alinhamento da placa metafásica da metáfase I. Ao final da primeira divisão meiótica, o número de cromossomos é reduzido a metade, bem como a formação do primeiro corpúsculo polar (núcleo expulso com baixa quantidade de citoplasma). Logo em seguida, entra-se na segunda divisão meiótica, com a formação da placa metafásica II, e, conseqüentemente, do ovócito secundário (LANDIM-ALVARENGA, 2017). A retomada e o término da segunda divisão meiótica ocorrem se o ovócito for fecundado ou se houver ativação partenogenética (KUBELKA et. al, 2000).

Enquanto a maturação nuclear abrange especialmente a segregação cromossômica, a maturação citoplasmática abrange a reorganização das organelas e o armazenamento de RNAm's e de fatores de transcrição. Esses elementos citoplasmáticos agem no mecanismo geral de maturação, de fecundação e de desenvolvimento embrionário, relacionados, assim, com a competência meiótica do ovócito, bem como com a sua capacidade de ser fecundado (ADONA et. al, 2008; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Vale mencionar que é observada, no ovócito bovino, uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação envolvida na retomada da divisão meiótica. Neste estágio, 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).

Em relação ao AMPc, diversos estudos apontam que seus níveis dentro do ovócito bovino estão relacionados com a modulação da retomada da divisão meiótica (BILODEAU E SIRARD, 1990; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

O MPF está intimamente envolvido no começo da maturação nuclear ovocitária. Uma vez ativado, torna-se capaz de fosforilar proteínas envolvidas no envelope nuclear, assim como na condensação de cromatina e na reorganização do citoesqueleto (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

3. COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA

A competência ovocitária é caracterizada como a capacidade ou potencial de um ovócito completar sua maturação (nuclear e citoplasmática), ser fecundado e desenvolver-se em blastocisto e em prole viva (DONNISON et. al, 2007).

Em grande parte das espécies mamíferas, a competência ovocitária é dependente e aumentada de acordo com o tamanho do folículo (diâmetro em torno de 9 a 13% do diâmetro ovulatório) (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

Para alcançar sua competência, o ovócito precisa completar seu crescimento (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005), o qual acontece quando ele atinge 120µm aproximadamente (GUIMARÃES, 2013).

A competência está associada ao crescimento folicular e às alterações ocorridas no núcleo e no citoplasma na etapa final do desenvolvimento folicular e da maturação. Dessa maneira, a competência ovocitária ocorre de forma progressiva no decorrer de uma organizada série de alterações funcionais e estruturais no ovócito e suas células do cumulus, sendo que o rearranjo dos grânulos corticais e as mudanças de número, atividade e distribuição das mitocôndrias acontecem nos momentos finais da maturação ovocitária *in vivo* (CHAMBERS et. al, 2008; GUIMARÃES, 2013).

Os folículos pré-antrais são formados quando há a formação de duas ou mais camadas de células da granulosa, momento esse em que o ovócito entra na fase de extenso crescimento, onde as células da granulosa apresentam-se mais proliferativas e há o começo do desenvolvimento de uma camada de células da teca. Além do mais, durante seu crescimento, os ovócitos também se diferenciam (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Dentre essas diferenciações, o ovócito apresenta um expressivo aumento na síntese de proteínas e de RNAm's, no número de ribossomos e de mitocôndrias, dentre outras organelas celulares. A mudança mais marcante é a formação da zona pelúcida (membrana glicoproteica), consistida em ZP1, ZP2 (esta já formada nos folículos primordiais) e ZP3, todas glicoproteínas (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Ainda, o desenvolvimento embrionário inicial é sustentado por proteínas maternas traduzidas de RNAm's gerados no decorrer da maturação citoplasmática (SANDRI, 2007).

Nesse sentido, a qualidade e a competência ovocitária é também determinada de acordo com sua eficiência no armazenamento de RNAm's, bem como com a sua capacidade de reativação dessas moléculas, as quais permanecem quiescentes, ao

longo da maturação, entre suas sínteses e o seu emprego no desenvolvimento embrionário antes da ativação do genoma embrionário (SANDRI, 2007).

Os elementos sintetizados no citoplasma durante a ovogênese são cruciais para a competência meiótica, fecundação e, assim, desenvolvimento embrionário. Se não ocorrer sincronia entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática, poderá acarretar prejuízo na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial (SANDRI, 2007).

A completa competência meiótica, em bovinos, é adquirida em folículos com 3mm de diâmetro em média, mas a competência ovocitária para retomar e completar a divisão meiótica e desenvolver-se em blastocisto é especialmente marcada na dominância folicular e após a luteólise, quando ocorre a capacitação ovocitária em relação à fecundação, em que o ovócito se prepara para um eventual desenvolvimento contínuo após ser fecundado (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

4. RETENÇÃO MEIÓTICA

No momento em que o ovócito é retirado do seu folículo, como é feito na produção *in vitro* de embriões, ocorre a espontânea retomada da meiose, a qual abrange a condensação dos cromossomos, resultando em bloqueio imediato da atividade de transcrição e, conseqüentemente, em alterações nos padrões de novas sínteses proteicas. Dessa maneira, esse ovócito é desprovido da fase de diferenciação e a competência é afetada (MARCHAL, et. al, 2000).

Na tentativa de reproduzir a fase de diferenciação ovocitária *in vitro*, estudos visam a retenção desses ovócitos no estágio de vesícula germinativa, seja pelo uso de sistemas de co-cultivo em meio que mimetiza o ambiente folicular, seja pelo uso de fármacos que interferem nos níveis de AMPc intracelular (MARCHAL, et. al, 2000), uma vez que esse segundo mensageiro, em alta concentração, realiza importante função na manutenção da retenção meiótica em estágio de vesícula germinativa (diplóteno da prófase I) (CHAUBE et. al, 2010).

Essa concentração intraovocitária se dá a partir da constante transferência de AMPc das células do cumulus para o ovócito pelas junções GAP (CHAUBE et. al, 2010). A regulação dessa concentração é dada pela atuação das enzimas Adenil ciclase (AC) e fosfodiesterase (PDE), que, respectivamente, sintetiza e degrada o AMPc (ANDERSEN et. al, 1998).

A alta concentração de AMPc intraovocitário é regulada, em especial: (i) pela ativação de receptores de proteína G estimulatória; e (ii) pela ação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). *In vitro*, pode ser regulada pela inativação das principais fosfodiesterases responsáveis pela degradação, por hidrólise, do AMPc. A ativação de receptores associados à proteína G, presentes na membrana plasmática ovocitária, estimula as proteínas Gs e, conseqüentemente, a adenilato ciclase, levando à síntese intraovocitária de AMPc. A ação da GMPc, que alcança o ovócito também pelas junções GAP, se dá com a inibição da hidrólise do AMPc pela PDE3A, a qual preserva a alta concentração de AMPc intraovocitário. Há também a alternativa, *in vitro*, de se utilizar inibidores, seletivos ou não, de PDE, que retêm a divisão meiótica (CHAUBE et. al, 2010).

4.1. Mecanismos da retomada da meiose

A alta concentração de AMPc leva à ativação da proteína quinase A (PKA), a qual age na fosforilação das subunidades do pré-MPF (MPF inativado), mantendo essa molécula inativada e, assim, mantém a retenção meiótica (CHAUBE et. al, 2010). Uma vez desfosforilado, o MPF estimula a condensação da cromatina, com conseqüente quebra da vesícula germinativa e reorganização do citoplasma ovocitário, retomando-se a divisão meiótica. Essa desfosforilação somente ocorre com a queda na concentração intraovocitária de AMPc (CHAUBE et. al, 2010; GUIMARÃES, 2013). Em síntese, a retomada da meiose inicia-se com a estimulação pelas gonadotrofinas, em especial do LH, ou com a retirada do ovócito do seu ambiente folicular (GUIMARÃES, 2013).

No caso da ação do LH, *in vivo*, há sua ligação em seu respectivo receptor, localizado nas células da granulosa mural, e conseqüente produção de AMPc pela via da adenil ciclase. Com o aumento de AMPc, ocorre a ativação da PKA, que, por sua vez, induz a ativação dos receptores, bem como a produção, de fator de crescimento epidermal (EGF-like) nas células do cumulus e da granulosa. Uma vez formados, os EGF-like's induzem a ativação da proteína ativada por mitógeno quinase (MAPK), a qual rompe as junções GAP, bloqueando a passagem de AMPc e de GMPc para dentro do ovócito (CHAUBE et. al, 2010; FREUDZON et. al, 2009).

A queda nas concentrações de GMPc leva à ativação da PDE3, reduzindo cada vez mais o nível de AMPc, por hidrólise. Com essa redução, há a inativação da PKA, que acarreta na desfosforilação das subunidades da pré-MPF e, assim, na ativação

da MPF. Em razão da sua ativação, o MPF estimula o reinício da divisão meiótica, bem como a expansão das células do cumulus (CHAUBE et. al, 2010; GUIMARÃES, 2013).

5. MODULADORES DE AMPc E PRÉ-MATURAÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos compreende a aspiração de complexos cumulus-ovócitos (COCs) oriundos de folículos antrais e seu cultivo em condições ideais até atingirem a metáfase II. Ocorre que, dentre esses ovócitos, poucos apresentam potencial de desenvolvimento a termo (GILCHRIST E THOMPSON, 2007).

Segundo Gilchrist e Thompson (2007), dois fatores da MIV devem ser destacados: (i) os COCs são retirados de forma mecânica, o que leva à perda do ambiente folicular, ambiente esse de inibição meiótica, ou seja, retomam a divisão meiótica espontaneamente; e (ii) normalmente os COCs são aspirados de folículos antrais de tamanho mediano, que não completaram seu desenvolvimento e, cujo ovócito, também não houve a devida capacitação, sendo um ovócito que não apresenta todos os elementos necessários para sustentar o início da embriogênese.

Em razão disso que embriões e fetos criados a partir da MIV apresentam potencial de desenvolvimento dificultado quando comparados àqueles gerados de ovócitos maturados *in vivo*, justificando a necessidade de estudos a fim de se melhorar os sistemas de MIV (GILCHRIST E THOMPSON, 2007).

Nesse sentido, a retenção meiótica surge como estratégia de melhoria da competência ovocitária, disponibilizando um tempo acrescido para que essas estruturas sofram as diferenciações necessárias para a aquisição de competência. Ou seja, a mencionada retenção proporciona, pelo tempo acrescido, uma sincronização mais adequada entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática (LE BEAUX E SIRARD, 2003).

Posto que a inibição da retomada da meiose possibilita a adequada síntese de RNAm mensageiro materno e síntese proteica específica, o ovócito terá chance de amadurecer adequadamente e suportar o desenvolvimento inicial embrionário (LE BEAUX E SIRARD, 2003).

Em razão disso que, como já exposto anteriormente, a retenção meiótica *in vitro* do ovócito em VG é uma significativa estratégia de melhoria, já que permite a sincronização da maturação ovocitária inclusive de ovócitos menos desenvolvidos,

que podem alcançar os ovócitos crescidos e sofrer prontamente a quebra da vesícula germinativa (LE BEAUX E SIRARD, 2003).

A retenção meiótica pode ser realizada com métodos fisiológicos, como, por exemplo, com o uso de fluido folicular, monocamadas de células da granulosa ou da teca e hemisseções de folículos (BILODEAU-GOESEELS, 2012), ou com o uso de substâncias que agem mantendo o pré-MPF ou inibindo a ação de fosfodiesterases, como, por exemplo, do tipo 3 (PD3) ou do tipo 4 (PD4) (CAIXETA, 2016; GUIMARÃES, 2013).

Dentre as substâncias utilizadas para a modulação de AMPc, pode-se mencionar o uso de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), de Peptídeo Natriurético do tipo C (NPPC) e de cilostamida.

O NPPC, agente natural sintetizado principalmente pelas células da granulosa mural, estimula a liberação de GMPc, pela sua atuação nas células do cumulus, desencadeando, assim, o bloqueio da PD3 intraovocitário, assumindo um papel na retenção meiótica (ALBERTINI et. al, 2014).

O IBMX, por sua vez, atua, transitoriamente, inibindo a fosfodiesterase, de forma não específica, enquanto a cilostamida age como inibidora específica de PDE3. Conseqüentemente, ambos impedem a degradação de AMPc e a retomada da divisão meiótica (ALBUZ et. al, 2010; ALVES et. al, 2019; GUIMARÃES, 2013; FIRST E SIRARD, 1988).

Em conjunto à estratégia de indução da retenção meiótica, há a de uso de cultura de pré-maturação (PM), ou maturação em duas fases, em que, na PM, adiciona-se inibidores da meiose e se fornece um tempo adicional para que o ovócito retirado do seu ambiente folicular alcance sua competência de desenvolvimento (ALBERTINI et. al, 2014; GUIMARÃES, 2013).

Assim, a associação dessas estratégias objetiva desencadear o aumento das concentrações de AMPc intraovocitárias e nas células do cumulus, mimetizando o que acontece nos COCs *in vivo* e, dessa forma, expandir a competência dos ovócitos aspirados na PIVE (CAIXETA, 2016; GUIMARÃES, 2013).

5.1. Produção embrionária com a pré-maturação

5.1.1. Pré-maturação suplementada com NPPC e IBMX

Ao avaliar a retenção meiótica pelo uso de NPPC na pré-maturação de ovócitos de fêmeas bovinas mestiças (*bos taurus x bos indicus*), por 6 horas, Caixeta (2016)

observou que mais de oitenta por cento dos ovócitos apresentavam-se retidos em VG, taxa maior que a do grupo maturado, que foi de 48%, o que indicou seu efetivo bloqueio meiótico. Porém, não foi observada diferença na taxa embrionária entre os grupos pré-maturados e não pré-maturados ($P < 0,05$).

Paramio, Soto-Heras e Thompson (2019) observaram que o grupo de ovócitos tratado com NPPC na pré-maturação por 6 horas permaneceu no estágio de VG (80%). Ao analisarem a associação do NPPC mais o IBMX, observaram que o grupo que recebeu esse tratamento apresentou uma melhor taxa de retenção meiótica (mais de 90%) quando comparado ao grupo tratado apenas com NPPC.

Nesse sentido, analisaram o desenvolvimento embrionário dos grupos submetidos aos supramencionados tratamentos. O grupo que recebeu o tratamento de associação entre NPPC e IBMX apresentou melhor taxa de desenvolvimento embrionário quando comparado ao grupo controle (Figura 1A) (PARAMIO, SOTO-HERAS E THOMPSON, 2019).

O grupo tratado apenas com IBMX demonstrou aumento na taxa de clivagem ($P < 0,05$) quando também comparado ao grupo controle, porém não apresentou efeito na taxa de desenvolvimento de blastocistos. O tratamento com NPPC não apresentou ($P > 0,05$) interferência nas taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário. Sobre a quantidade de células do blastocisto, os grupos experimentais não demonstraram diferença entre si (Figura 1B) (PARAMIO, SOTO-HERAS E THOMPSON, 2019).

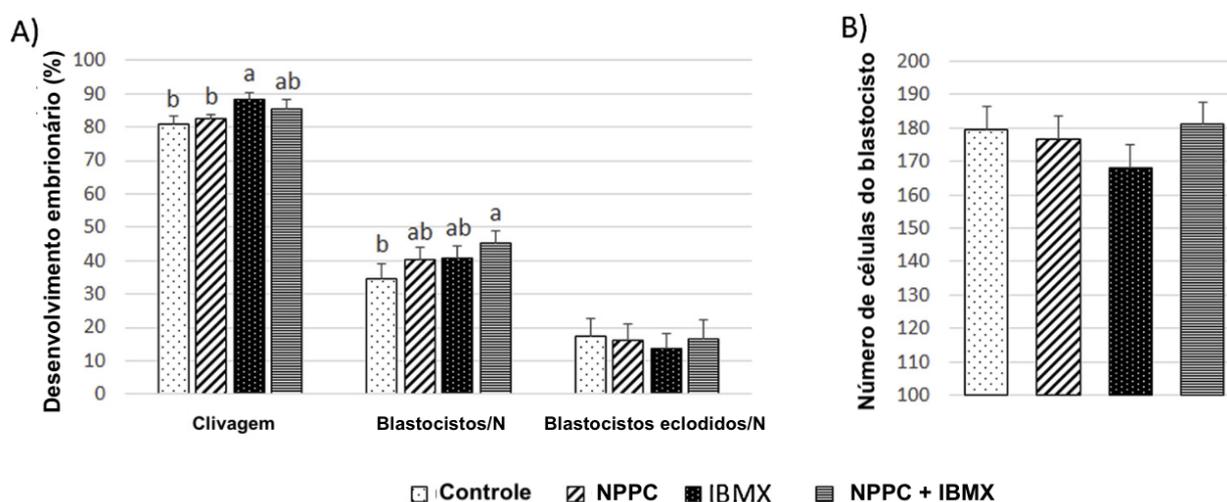


Figura 1. Efeito de 6 h pré-MIV com NPPC e IBMX seguido de MIV padrão na produção de embriões bovinos (A) e número total de células (B) aos 8 dias pós-fecundação. Os COCs foram cultivados em meio Pré-MIV por 6 h suplementado com 100 nM NPPC, 500 μ M IBMX ou 100 nM NPPC + 500 μ M IBMX, seguido por 20 h MIV. Um grupo de COCs foi MIV por 24 h sem pré-MIV prévia (Controle). Cinco réplicas foram realizadas com pelo menos 183 ovócitos cultivados e 60 blastocistos avaliados quanto

ao número de células por tratamento. N = nº de ovócitos imaturos. Cada barra representa média \pm e. p. m. Diferentes letras sobrescritas (a–c) em cada coluna representam diferenças ($P < 0,05$).

Fonte: Adaptado de PARAMIO, SOTO-HERAS E THOMPSON, 2019.

5.1.2. Pré-maturação suplementada com Butirolactona I

Adona et. al (2008) observaram que a taxa de retenção meiótica em VG dos ovócitos bovinos tratados, por 24 horas, com butirolactona (BLI) inibidora de quinase dependentes de ciclina (CDK), foi similar à taxa do estágio nuclear dos ovócitos recém aspirados ($P > 0,05$). Experimentos acerca da reversibilidade da retenção meiótica realizados por esses mesmos autores demonstraram que a taxa de metáfase II foi de 90% em todos os grupos tratados com BLI. No entanto, ao analisarem a taxa de desenvolvimento embrionário dos ovócitos submetidos ao mencionado tratamento, foi observado que a taxa de clivagem, a taxa embrionária no D8 e o número total de blastômeros foram semelhantes em todos os grupos, havendo diferença ($p < 0,05$) apenas no desenvolvimento embrionário do grupo controle e do grupo tratado com BLI a 10 μ M quando comparados ao grupo tratado com 100 μ M de BLI (Tabela 1).

Tabela 1: Desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos fecundados *in vitro* após bloqueio meiótico com 10 e 100 μ M de butirolactona I

Tratamentos ^a	Ovócitos (n)	Desenvolvimento embrionário			
		Clivagem n (média % \pm D.P.)	Blastocisto D7 ^b n (média % \pm D.P.)	Blastocisto eclodido D8 ^c n (média % \pm D.P.)	Número total de células (média % \pm D.P.) ^d
Controle	120	103 (85.8 \pm 6.1)	46 (38.3 \pm 3.2) ^a	23 (19.2 \pm 3.7)	138 \pm 30
B10	113	98 (86.7 \pm 4.7)	47 (41.6 \pm 2.2) ^a	20 (17.7 \pm 1.9)	136 \pm 21
B100	109	88 (80.7 \pm 2.0)	36 (33.0 \pm 3.5) ^b	12 (11.0 \pm 1.4)	150 \pm 22

Resultados de quatro repetições. Letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$).

^a Controle, ovócitos maturados *in vitro* sem bloqueio meiose prévio; tratados (B10 e B100), ovócitos bloqueados por 24 h com 10 e 100 μ M BLI em meio TCM199 suplementado (B100) ou não (B10) com BSA e então submetidos à maturação *in vitro*.

^b Proporção de blastocistos desenvolvidos em relação ao número total de ovócitos após 7 dias (D7) *in vitro*.

^c Proporção de embriões eclodidos em relação ao número de ovócitos após 8 dias de cultivo (D8).

^d Número médio de células totais em blastocistos D8 e desvio padrão.

Fonte: Adaptado de ADONA et. al, 2008.

5.1.3. Pré-maturação suplementada com Forskolin e IBMX

Ao analisarem o desenvolvimento embrionário dos ovócitos bovinos, de diferentes raças, submetidos à pré-maturação com Forskolin (FSK), ativador de

adenilato ciclase, e IBMX, e, sequencialmente, à maturação, Gilchrist et. al (2016) observaram que houve precocidade na clivagem embrionária (22 horas pós-FIV) quando comparados ao grupo controle sem pré-maturação (Figura 2B).

Apesar de a taxa final de clivagem não apresentar diferença significativa entre os grupos submetidos à pré-maturação e o grupo controle, os grupos tratados apresentaram aumento na taxa embrionária (blastocistos/embriões clivados) quando comparados ao grupo sem tratamento (Figura 2D). Cabe ressaltar que os mencionados autores pontuam que todos os grupos tratados apresentaram melhora na qualidade dos blastocistos, uma vez que houve aumento no número de células totais, em especial na massa celular interna (MCI), quando comparados ao grupo sem tratamento (Figura 2F) (GILCHRIST et. al, 2016).

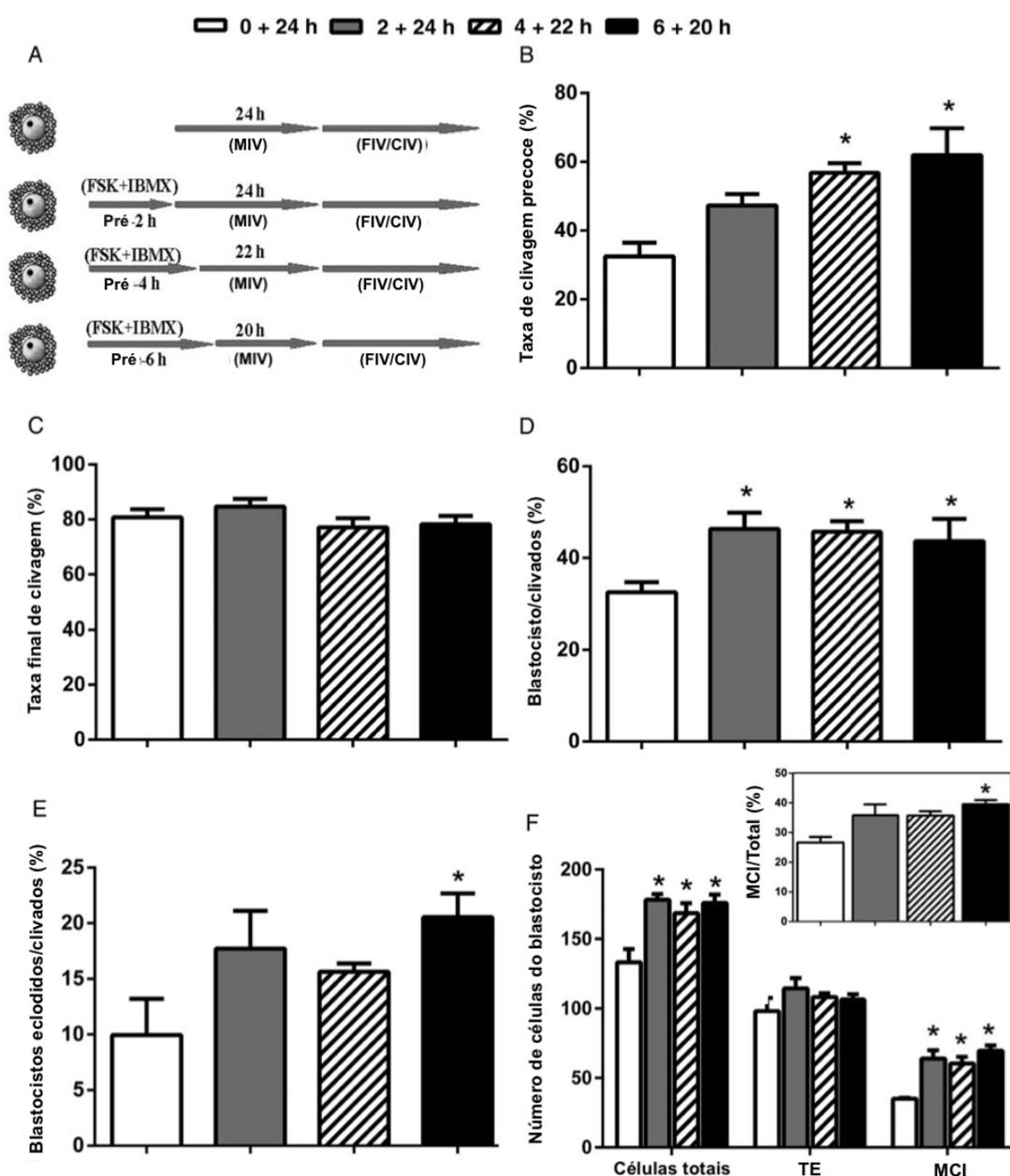


Figura 2. Efeito da duração pré-MIV seguida de MIV padrão no desenvolvimento embrionário bovino. Os COCs foram submetidos a 0, 2, 4, 6 h pré-cultura de MIV na presença de FSK e IBMX, seguido de MIV padrão na presença de FSH por 24, 24, 22 ou 20 h, respectivamente (A). A capacidade de desenvolvimento do ovócito foi avaliada ($n \geq 146$ COCs pré-grupo de cinco experimentos replicados) após a fecundação *in vitro* pela taxa de clivagem precoce (B, embriões clivados/ovócitos imaturos às 22 h no Dia 1), taxa de clivagem final (C, embriões clivados/ovócitos imaturos avaliada no Dia 5), taxa de blastocistos (D, blastocistos totais/embriões clivados totais avaliados no Dia 8) e taxa de blastocistos eclodidos (E, blastocistos eclodidos/embriões clivados totais avaliados no Dia 8). A qualidade do blastocisto (F, Dia 8) foi avaliada pela quantificação do número de trofotoderma (TE), massa celular interna (MCI) e células totais, e a razão MCI:células totais ($n = 25 - 29$ por grupo). Os dados são média \pm EPM. Asterisco dentro de cada gráfico indica significativamente diferente ($P < 0,05$; ANOVA de uma via) para o controle (0 + 24 h). Fonte: Adaptado de GILCHRIST et. al, 2016.

Por outro lado, o estudo realizado por Belaz et. al (2018) concluiu que, apesar de uma taxa embrionária sutilmente aumentada, não houve diferença significativa entre o grupo pré-maturado com FSK e IBMX e o grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Desenvolvimento embrionário de complexos cumulus-ovócitos bovinos (COCs) submetidos à MIV padrão (controle) e a pré-tratamento com 100mmol L^{-1} FSK e $500\ \mu\text{mol L}^{-1}$ IBMX por 2 h antes da MIV (pré-MIV).

Tratamento	Número de ovócitos	Número de clivagem Dia 5 (% \pm e.p.m.)	Número de blastocistos Dia 7 (% \pm e.p.m.)
Controle	386	226 (58.5 \pm 5.2)	83 (21.5 \pm 4.4)
Pré-MIV	499	271 (54.3 \pm 3.7)	137 (27.4 \pm 3.9)

Fonte: Adaptado de BELAZ et. al, 2018.

5.1.4. Pré-maturação suplementada com Cilostamida

Caixeta (2016) avaliou a capacidade de retenção meiótica de ovócitos bovinos, de raças mestiças, pré-maturados com cilostamida por 6 horas. O grupo pré-maturado apresentou menor taxa de VG quando comparado ao grupo controle. Porém, após 20 horas submetidos à maturação, os ovócitos pré-tratados apresentaram maior taxa de metáfase II do que os do grupo MIV.

No que tange à produção embrionária, não foi observada diferença ($P < 0,05$) nas taxas de clivagem e de blastocistos entre os grupos com e sem pré-maturação, demonstrando que o tratamento com cilostamida não apresentou efeito na competência ovocitária no que se refere ao desenvolvimento embrionário (Tabela 3) (CAIXETA, 2016).

Tabela 3: Efeito da Pré-Maturação (PM) por 6 horas com 5 μ M cilostamida ou não (MIV) em ovócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro*.

Tratamento	N	Nº Embriões (%)	
		Clivados D2	Blastocisto D7 (%)
MIV	133	104 (78,2)	47 (35,5)
PM	147	113 (76,9)	43 (29,3)

Fonte: Adaptado de CAIXETA, 2016.

6. SISTEMA DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA FISIOLÓGICA SIMULADA – SISTEMA SPOM

O sistema SPOM (*simulated physiological oocyte maturation*) busca mimetizar a maturação ovocitária fisiológica, que visa inserir, na maturação *in vitro*, sinais inter e intracelulares que agem nos COCs *in vivo* e que melhorariam a qualidade e o desenvolvimento dos ovócitos maturados *in vitro* (ALBUZ et. al, 2010; CARVALHEIRA et al., 2022).

Esse sistema é dividido em duas fases: fase de pré-maturação e fase de maturação. Na primeira, os ovócitos aspirados são submetidos, por curto período, a meio de pré-maturação suplementado com FSK e com IBMX – visando aumento nos níveis de AMPc; e na segunda fase são expostos a meio de maturação estendida com cilostamida – visando a prevenção da hidrólise do AMPc ovocitário – e FSH (Figura 3) (ALBUZ et. al, 2010; GILCHRIST, 2011; GUIMARÃES 2013).

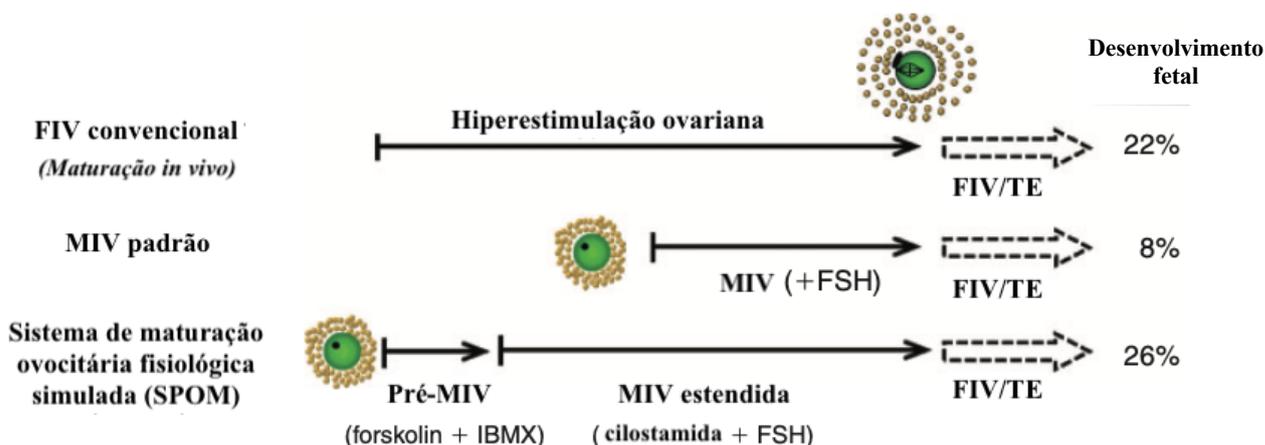


Figura 3. Ilustração esquemática do sistema SPOM MIV e como ele difere do MIV padrão e da FIV convencional. O SPOM é caracterizado por uma fase pré-IVM curta, em que os COCs são expostos a agentes que causam um pico de AMPc, e por uma fase MIV estendida, em que o FSH induz a maturação do ovócito na presença contínua de um inibidor de PDE específico do ovócito. O SPOM gera taxas de fertilização em murinos, blastocisto, implantação e desenvolvimento fetal comparável à

fecundação *in vitro* convencional acionada por hormônio. Figura modificada de Albuz et al. (2010).
Fonte: Adaptado de GILCHRIST, 2011.

De acordo com Albuz et. al (2010), os níveis de AMPc intraovocitário de ovócitos bovinos permaneceram mais elevados até o final da MIV quando os moduladores de AMPc foram incluídos nas duas fases. Ademais, os mesmos pesquisadores observaram que o tratamento da primeira etapa proporcionou melhora na ligação entre as junções GAP e o ovócito, o que também desacelerou a retomada e a finalização da maturação nuclear ovocitária (GILCHRIST, 2011).

Quando comparado ao padrão clínico de MIV, Albuz et. al (2010) observaram melhora na taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário quando a etapa de MIV foi estendida por 30 horas. Foi observado também maior qualidade desses embriões formados, os quais apresentaram aumento no número total de blastômeros, incluindo maior taxa de massa celular interna (MCI) por número de células totais (Figura 4).

Nesse sentido, Dode et. al (2014) testaram o sistema SPOM adaptado na maturação de ovócitos bovinos e, apesar de os blastocistos formados apresentarem tamanho e número total de células similares aos formados no grupo controle, a taxa de desenvolvimento embrionário foi baixa, concluindo-se que a adaptação do sistema SPOM para diferentes formas de cultivo não apresenta melhora na PIVE.

Por fim, Carvalheira et. al (2022), ao realizarem uma análise sistemática dos dados encontrados na literatura quanto ao uso do citado sistema e realizarem comparações entre os resultados de diversos experimentos com os resultados do experimento original, observaram notável dificuldade na sua replicação por outros laboratórios, indicando que não basta a retenção meiótica para a efetividade no uso do sistema SPOM.

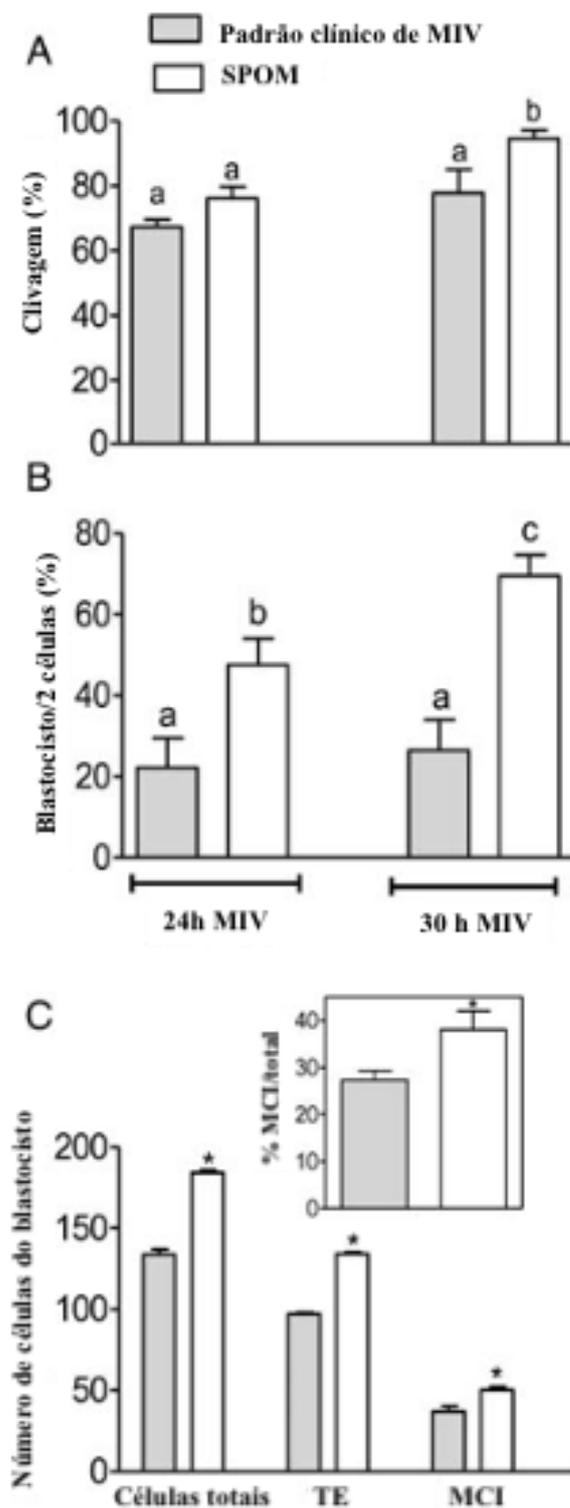


Figura 4. O efeito da maturação de ovócitos bovinos *in vitro* usando padrão clínico de MIV ou SPOM, por 24 ou 30 h, na capacidade de desenvolvimento do ovócito e na qualidade do blastocisto. A capacidade de desenvolvimento do ovócito foi avaliada após FIV e desenvolvimento embrionário por taxa de clivagem (A, Dia 2) e taxa de blastocisto (B, Dia 8). Padrão clínico de MIV = pré-MIV controle e MIV padrão com FSH. SPOM = pré-MIV com FSK + IBMX e MIV com cilostamida + FSH. (A e B) As colunas representam média \pm EPM de 4 réplicas com 45 ovócitos/tratamento para cada réplica. As médias dentro de um gráfico com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$). (C) Efeito do padrão clínico de MIV e SPOM na qualidade do blastocisto bovino. Após 30 h de MIV, os COCs foram fecundados e os embriões cultivados até o dia 8 e, em seguida, a qualidade do blastocisto foi quantificada por contagens de células totais e alocação de células para trofoectoderme (TE) ou MCI. As colunas representam média \pm EPM de 20 blastocistos de 4 experimentos replicados. *Significativamente diferente do padrão clínico de MIV ($P < 0,05$). Fonte: Adaptado de ALBUZ et. al, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ante o levantamento bibliográfico, foi observado que o uso isolado de NPPC e de Butirolactona I apresentou efetividade na retenção meiótica, mas não na melhora da taxa de desenvolvimento embrionário. Por outro lado, pesquisas constataram que o uso de NPPC em conjunto ao IBMX apresentou tanto retenção meiótica quanto melhora no desenvolvimento embrionário.

Caixeta (2016) observou que o grupo tratado com cilostamida teve menor taxa de retenção meiótica quando comparado ao grupo controle. Ademais, esse mesmo autor não observou diferença na produção embrionária entre os grupos com ou sem o tratamento.

Verificou-se que o uso de Forskolin mais IBMX apresentou divergência entre alguns autores. Gilchrist et. al (2016) demonstraram que houve melhoras no desenvolvimento embrionário e Belaz et. al (2018) demonstraram que não houve diferença significativa.

O sistema SPOM, que surge como uma técnica revolucionária, apresenta hipóteses e resultados valiosos para a maturação *in vitro*, mas que outros laboratórios ainda não conseguiram replicar.

Assim, diante dos dados encontrados na literatura, observa-se que o uso de moduladores de AMPc é uma ferramenta que ainda precisa ser mais estudada e analisada por meio de experimentos antes de ser incrementada na PIVE, o que também vale para o sistema SPOM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONA, P. R.; DE BEM, T. H. C.; LEAL, C. L. V.; MESQUITA, L. G.; ROCHETTI, R. C. Embryonic Development and Gene Expression in Oocytes Cultured In Vitro in Supplemented Pre-Maturation and Maturation Media. **Reprod Dom Anim**, Pirassununga/SP, v. 46, p. 1-8, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20403123/>. Acesso em: 3 maio 2022.
- 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: 31 maio 2022.
- 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: 7 maio 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: 27 abr. 2022.
- 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: 23 abr. 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.

BELAZ, K. R. A.; CASTILHO, A. C. S.; EBERLIN, M. N.; FONTES, P. K.; FRANCHI, F. F.; MACHADO, M. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; RAZZA, E. M.; ROCHA, D. F. O.; SANTOS, P. H.; SUDANO, M. J. Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus–oocyte complexes and blastocysts. **Reprod Fertil Dev.**, [s. l.], v. 30, p. 1314-1328, out. 2018. DOI 10.1071/RD17335. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29681258/>. Acesso em: 31 maio 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: 3 maio 2022.

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: 3 maio 2022.

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 abr. 2022.

BILODEAU-GOESEELS, S. GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Reprod Dom Anim**, Lethbridge, v. 47, p. 1-7, ago. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21988654/>. Acesso em: 6 maio 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: 6 maio 2022.

CAMARGO, L. S. A., ROCHA, E. **Produção in vitro de embriões bovinos, clonagem animal e apoptose**. In: PASSOS, L. P. (ed.). Coletânea de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite-PIBIC CNPq 2020-2021. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2021. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1134682/1/Producao-in-vitro.pdf>. Acesso: 27 abr. 2022.

CARVALHEIRA, L. R.; FABJAN, J. M. G. S.; LEAL, G. R.; MONTEIRO, C. A. S. The Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM) system in domestic animals: A systematic review. **Theriogenology**, [s. l.], v. 188, p. 90-99, jun. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.023>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X22002047?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jun. 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: 5 maio 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 2022.

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.

DODE, M. A. N.; GUIMARÃES, A. L. S.; LEME, L. O.; PEREIRA, S. A. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system (SPOM) for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, [s. l.], v. 83, p. 52-57, jan. 2015. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.07.042. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X14005226?via%3Dihub>. Acesso em: 1 jun. 2022

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 37, ed. 2, p. 145-150, abr./jun. 2013. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag145-150%20%28RB453%29.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2022.

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: 3 maio 2022.

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 maio 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**, [s. l.], v. 136, p. 1869-1878, jun. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19429786/>. Acesso em: 6 maio 2022.

GILCHRIST, R. B.; LI, H. J.; SUGIMURA, S.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; THOMPSON, J. G.; WANG, X. Extending prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality

via gap junctions. **Hum. Reprod.**, [s. l.], v. 31, p. 810-821, abr. 2016. DOI 10.1093/humrep/dew020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26908844/>. Acesso em: 30 maio 2022.

GILCHRIST, R. B.; RICHANI, D.; SMITZ, J.; THOMPSON, J. G.; WANG, X.; ZENG, H. T. Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. **Theriogenology**, [s. l.], v. 84, ed. 4, p. 656-657, set. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X15001612?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jun. 2022.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 23, ed. 1, p. 23-31, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21366977/>. Acesso em: 12 jun. 2022.

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 2022.

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. 2022.

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 2022.

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. 2022.

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 2022.

PARAMIO, M. T.; SOTO-HERAS, S.; THOMPSON, J. G. Effect of pre-maturation with C-type natriuretic peptide and 3-isobutyl-1-methylxanthine on cumulus-oocyte communication and oocyte developmental competence in cattle. **Anim Reprod Sci.**, [s. l.], v. 202, p. 49-57, mar. 2019. DOI 10.1016/j.anireprosci.2019.01.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30772104/>. Acesso em: 31 maio 2022.

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: 5 maio 2022.

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. 2022.

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: 2 maio 2022.