



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – CEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE**

LILIANA MARIA CASAGRANDE RODRIGUES

**ADIÇÃO DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OVÓCITOS E SUA RELAÇÃO COM
A COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA.**

**BRASÍLIA
2023**

LILIANA MARIA CASAGRANDE RODRIGUES

**ADIÇÃO DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OVÓCITOS E SUA RELAÇÃO COM
A COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA.**

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Educação e Saúde para obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária do Uniceub.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis.

**BRASÍLIA
2023**

LILIANA MARIA CASAGRANDE RODRIGUES

**ADIÇÃO DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OVÓCITOS E SUA RELAÇÃO COM
A COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA.**

Monografia apresentada à Faculdade de
Ciências da Educação e Saúde para
obtenção do grau de bacharel em Medicina
Veterinária do Uniceub.

Brasília, _____ de _____ de 2023.

Banca examinadora

Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis
Orientador/CEUB

Prof. Dra. Francislete Melo Rodrigues
Examinador interno/CEUB

Dra. Nayara Ribeiro Kussano
Examinador externo/EMBRAPA/FAP-DF

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar comigo ao longo de toda essa caminhada em busca de conhecimento e experiências, e por me ensinar que tudo vem com um propósito e se vai por uma razão, sempre no tempo Dele.

Agradeço à minha família, que me permitiu realizar o desejo de me graduar em Medicina Veterinária e me deu todo o apoio e suporte em minhas decisões ao longo da faculdade. Em especial à minha irmã, Letícia, por ser uma pessoa tão parceira e compreensiva.

Agradeço à Med. Vet. Joanna Dennise Ledra Vasconcellos e seu marido, Dr. Carlos Henrique Camara Saquetti, por me concederem a oportunidade de dar os primeiros passos na vida prática em fazenda, por todo aprendizado, acolhimento e por despertarem em mim o interesse na área de grandes animais. Sou grata também à Adjanete (Netinha) e Seu Norberto, que me acolheram em sua casa e seus corações durante minha estadia na Kanimambo. Muito obrigada por todo o cuidado, carinho, colo, momentos felizes e amizade que levarei para a vida toda.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis, pelas oportunidades, conhecimentos compartilhados, inspiração profissional, além de toda a paciência e acolhimento. Você foi essencial para aguçar meu interesse na área e instiga em mim o desejo de me aprimorar e superar cada vez mais os meus limites, sou muito grata pelo privilégio de ser sua orientanda e pupila.

À Dra. Margot Dode e à Dra. Nayara Kussano pelos conhecimentos compartilhados e por todo o auxílio e paciência.

Meus agradecimentos aos amigos e companheiros de estágio e do Uniceub, que me receberam de braços abertos, em especial à Danielle Bárbara e Hallya Beatriz, pelos conselhos, por ouvirem meus desabaços, me apoiarem e acolherem de uma forma tão querida, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

"Envelhecer, qualquer animal é capaz. Desenvolver-se é prerrogativa dos seres humanos. Somente uns poucos reivindicam esse direito".

(Osho)

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica importante que está associada à aceleração do melhoramento genético do rebanho, sendo que o crescimento do seu uso comercial em bovinos no Brasil levou o país a alcançar uma posição de destaque no mercado internacional. Entretanto, a PIVE ainda possui algumas limitações, sendo uma delas as baixas taxas de blastocisto em relação às da produção *in vivo*, o que ocorre pelo fato dos ovócitos que são utilizados na maturação *in vitro* (MIV) não possuírem competência ovocitária para se desenvolver até a fase de embrião devido sua retirada prematura do ambiente folicular. Vários estudos foram realizados com o intuito de buscar alternativas para aumentar a competência ovocitária e, conseqüentemente, a eficiência da PIVE, sendo um deles a adição de hormônio do crescimento (GH) na MIV, o que vem apresentando resultados promissores. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi buscar, através de uma revisão bibliográfica narrativa, os efeitos que a adição do GH no meio de MIV exercem sobre a competência ovocitária. Estudos demonstram os efeitos benéficos desse hormônio e que ele pode ter um papel importante no processo de aquisição de competência ovocitária, havendo fortes indícios que o uso de GH em MIV pode levar à produção de ovócitos mais competentes e, assim, aumentar a taxa de blastocistos da PIVE, porém ainda é necessário a realização de mais experimentos e pesquisas visando uma melhor compreensão do papel do GH na maturação ovocitária e como ele se comporta durante a MIV de ovócitos competentes e incompetentes.

Palavras-chave: PIVE; maturação ovocitária; GH; expressão gênica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. OBJETIVO	8
2. METODOLOGIA	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. MATURAÇÃO OVOCITÁRIA	10
3.2. COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA	12
3.3. RETOMADA DA MEIOSE: AMPc e GMPc	13
3.4. MATURAÇÃO IN VITRO	15
3.5. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)	16
3.4.1. RECEPTORES DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GHR)	17
3.4.3. GH NA MATURAÇÃO IN VITRO	17
3.4.3. RELAÇÃO ENTRE O USO DE GH NA MIV E COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA	18
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

O uso da produção *in vitro* de embriões (PIVE) no Brasil permaneceu restrito a laboratórios de pesquisa até o fim dos anos 90, mas no período entre 2004 e 2006 o país conquistou o título de maior produtor mundial e passou a ser referência no uso comercial de PIVE em bovinos (LIMA, 2014). O destaque brasileiro se deve não só pelo domínio da técnica (PELLEGRINO, 2013; LUEDKE et al., 2019), mas também pela extensão e características do seu rebanho comercial, composto principalmente por raças zebuínas, cuja produção de ovócitos é superior à de raças taurinas (MELLO et al., 2016).

Dentre as técnicas de reprodução assistida, a PIVE, associada à coleta de ovócitos através da punção guiada por ultrassom (*Ovum Pick Up* – OPU), tem desempenhado um importante papel na aceleração do melhoramento genético em rebanhos de alto mérito genético (PELLEGRINO, 2013), por ser capaz de reduzir o intervalo de gerações, uma vez que permite a reprodução de fêmeas bem jovens, a partir dos 6 meses de idade (MELLO et al., 2016; LUEDKE et al., 2019). Além disso, através da PIVE é possível produzir embriões viáveis a partir de fêmeas de alto valor genético com patologias reprodutivas adquiridas, gestantes ou em período pós-parto, permitindo que as doadoras usadas na PIVE tenham a uma maior vida reprodutiva e um menor intervalo de produção de embriões quando comparadas às utilizadas na produção *in vivo* de embriões (Múltipla Ovulação e Transferência de Embrião – MOET) (MELLO et al., 2016).

Apesar da PIVE ter atingido escala comercial, essa técnica ainda possui algumas limitações, como as baixas taxas de blastocistos quando comparadas com a produção *in vivo*. Um dos fatores que contribui para esses índices é o uso de ovócitos de competência inferior aos da maturação *in vivo* (GUIMARÃES, 2013) de forma que apenas 25 a 40% dos ovócitos usados na MIV são competentes, enquanto *in vivo* essa taxa atinge um percentual de 60 a 80% (FARIN et al., 2007), implicando na diminuição da capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* (GONÇALVES et al., 2007).

A competência ovocitária é adquirida principalmente durante o final do crescimento folicular (DODE et al., 2006) e é essencial para o sucesso da PIVE por ser determinante para que os ovócitos consigam completar sua maturação,

fecundação, desenvolver até a fase de blastocisto e gerar uma prenhez capaz de vir a termo (DONNISON et. al, 2007; GALLI et. al., 2007).

Os ovócitos usados na MIV são coletados de uma população de folículos de diâmetro pequeno a médio (2 – 8 mm) (SENEDA et al., 2001; LEIVAS, 2004), o que caracteriza estarem na fase imatura de seu desenvolvimento. A retirada dos ovócitos, neste momento, impede que estes sofram alterações importantes para aquisição de competência (LONERGAN et al., 2003) visto que estimula a retomada espontânea da meiose (GILCHRIST & THOMPSON, 2007). Em razão disso, os ovócitos usados na MIV são incompetentes, o que pode prejudicar os resultados da produção *in vitro* (GUIMARÃES, 2013).

Vários estudos foram conduzidos no sentido de contribuir para avaliação do efeito de determinados hormônios e fatores de crescimento sobre os ovócitos durante a MIV visando assim, melhor eficiência da PIVE (BEVERS & IZADYAR, 2002). Através de experimentos utilizando o hormônio de crescimento (GH) foi possível observar que quando adicionado ao meio de MIV o GH causa efeitos benéficos que somente se manifestam quando há a ligação entre esse hormônio e seus receptores localizados nas células do cumulus (CCs) (BEVERS & IZADYAR, 2002; OYAMADA et al., 2004; CONTI et al., 2006) que contribuem no processo de aquisição de competência pelo ovócito (GUIMARÃES, 2013).

1.1. OBJETIVO

Descrever os achados da literatura que relatam a adição do GH em meio MIV e seus efeitos no aumento de competência ovocitária.

2. METODOLOGIA

Realizou-se uma revisão narrativa da literatura de modo a obter-se informações a respeito dos efeitos do GH sobre os ovócitos quando adicionado à MIV e sua relação com a aquisição de competência ovocitária. Os artigos incluídos foram obtidos através das plataformas ResearchGate, PubMed, Science Direct, Scielo, Plataforma Sucupira, Revista Brasileira de Reprodução Animal, Repositório Institucional da UnB, Repositório Acesso Livre à Informação Científica da Embrapa (Alice) e Repositório Institucional da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As palavras-chaves utilizadas no Research Gate foram “GH” OR “growth hormone” AND “in vitro maturation”. Quanto aos critérios de inclusão, foram selecionados artigos de periódicos no idioma inglês entre 1996 e 2022, que elucidavam sobre alguns tópicos do tema, que são: ação do GH sobre o sistema reprodutor feminino de bovinos, os efeitos do GH em meio MIV que melhoram a competência ovocitária, localização dos receptores do hormônio GH (GHR) no sistema reprodutor feminino e o mecanismo pelo qual o GH atua sobre os ovócitos bovinos quando adicionado na MIV. Foram excluídos da revisão os trabalhos de idioma diferente do português e inglês, duplicados, além dos que estavam fora do tema escolhido. Ao final, foram selecionados e incluídos 5 trabalhos nessa revisão narrativa. Já ao utilizar “in vitro maturation” OR “IVM” AND “oocytes” AND “gene expression” AND “competence” foram selecionados 13 trabalhos, incluindo teses, dissertações e artigos de periódicos, que foram publicados entre 1994 e 2009 e se encontravam dentro dos temas de GH como marcador molecular para competência ovocitária e produção de embriões bovinos com adição do GH ao meio de maturação, sendo excluídos trabalhos duplicados, fora dos temas propostos ou que abordavam sobre esses temas mas animais diferentes de bovinos. Através do uso dos termos “growth hormone” AND “IVM” AND “bovine”, foram selecionados 15 trabalhos que abordavam sobre o mecanismo de retomada da meiose, maturação ovocitária *in vivo* e *in vitro*, assim como o uso de GH em meio MIV e seus efeitos benéficos.

No PubMed foram selecionados artigos e periódicos, teses e dissertações no idioma inglês e português entre 2011 e 2022. Ao utilizar “growth hormone” AND “oocyte” AND “maturation” AND “bovine” OR “cattle” como palavras-chaves foram descartados os trabalhos que incluíram outras espécies além de bovinos em sua amostra e cujo conteúdo se encontrava fora dos seguintes temas: hormônio do crescimento na MIV e marcadores moleculares relacionados à competência ovocitária, resultando na utilização de dois trabalhos. Enquanto durante o uso de “gene expression” OR “molecular markers” AND “cumulus cells” and “oocyte” AND “in vitro maturation” foram utilizados 5 trabalhos, publicados entre 2000 e 2021, relacionados com a quantificação de genes candidatos a marcadores de competência presentes nas células do cumulus de bovinos durante a maturação. Foram selecionados 3 trabalhos em inglês publicados no período entre 2019 e 2022 ao se utilizar “growth hormone” AND “IVM” AND “bovine” como palavras-chave e o tema “uso de GH em meio de MIV de ovócitos de espécies domésticas e humanos” como

fator de inclusão, sendo descartados as publicações que não se encaixavam nesse tema.

Na plataforma Science Direct foram usadas as palavras-chaves “oocyte” OR “embryo” AND “in vitro” AND “maturation” AND “competence”, sendo utilizados artigos de periódicos de 2000 a 2007 em inglês e português sobre genes relacionados à competência de ovócitos bovinos e uso do GH na MIV. Foram excluídos trabalhos que abordavam sobre os assuntos propostos, mas não incluíam a espécie bovina e o hormônio GH e que não tinham relação com os tópicos escolhidos, resultando na utilização de um total de 7 trabalhos. Quando “growth hormone” AND “IVM” AND “BOVINE” foram usadas como palavras-chave, 10 trabalhos em inglês publicados entre 1996 e 2015 que abordavam sobre os efeitos do GH em meio MIV e o processo de MIV foram selecionados, sendo excluídos os que não tinham relação com esse tema.

Os parâmetros de inclusão usados na Scielo para “bovine” AND “IVM” AND “oocyte competence” foram a espécie, tema e tipo de trabalho, sendo excluídos os que não abordavam sobre bovinos, estavam fora do tema e eram anais de congresso, resultando na utilização de 5 trabalhos.

Na Revista Brasileira de Reprodução Animal os termos utilizados foram “in vitro production” OR “maturation” AND “embryo” OR “oocyte”, sendo incluídos 3 artigos de 2008, 2009 e 2016 sobre a PIVE e competência ovocitária durante a MIV de bovinos. Foram excluídos trabalhos fora desses temas.

No repositório Institucional da UnB, na ALICE e no repositório da UFU as palavras-chave usadas foram “expressão gênica” AND “células do cumulus” AND “competência ovocitária”, tendo sido selecionadas, no total, 3 dissertações (uma de cada plataforma) publicadas entre 2011 e 2015. Foram excluídas teses e dissertações cujo conteúdo não se encaixava dentro dos temas citados.

Na plataforma Sucupira foram selecionadas 2 dissertações em português, uma de 2015 e a outra de 2020, que discorriam sobre os efeitos que a adição de hormônios no meio de maturação causa sobre a produção de embriões. Foram descartados trabalhos que não tinham relação com esse tema e publicados antes de 2014.

Foram utilizadas 5 publicações da Revista Brasileira de Reprodução Animal publicadas entre 2007 e 2016 que discorriam sobre a história da PIVE no Brasil

e a relação entre maturação e competência ovocitária, sendo desconsideradas as publicações que não possuíam relação com esses assuntos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

Durante a vida fetal das fêmeas de mamíferos, há o início do processo de ovogênese e foliculogênese, assim como a estagnação do núcleo do ovócito na fase de diplóteno da prófase I da meiose, onde permanece durante todo o período de crescimento e desenvolvimento folicular (SATHANANTHAN, 1994; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

A retomada e conclusão da primeira divisão meiótica, assim como o início da maturação ovocitária, ocorrem durante o período púbere do animal após o estímulo do pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), em ovócitos que atingiram crescimento máximo e competência meiótica, os quais se encontram dentro de folículos pré-ovulatórios (GILBERT et al., 2011; GUIMARÃES, 2013).

O conjunto de mudanças que ocorrem no ovócito desde a primeira retomada da meiose até o segundo bloqueio meiótico (metáfase II) é denominado maturação ovocitária. (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Durante essa fase o ovócito adquire a competência necessária para completar a maturação, ser fecundado e gerar um embrião viável, sendo uma etapa determinante para o sucesso da PIVE (GOTTARDI & MINGOTI, 2009; SIRARD et al., 2006).

O processo de maturação ovocitária é composto pela maturação nuclear e citoplasmática (SIRARD, 2001). A maturação nuclear se inicia quando o núcleo do ovócito sai do estágio de vesícula germinativa (VG) e é concluída quando ele estaciona em metáfase II. Nesse período, os cromossomos se condensam e a carioteca se rompe (GOTTARDI & MINGOTI, 2009), o núcleo conclui a prófase I e prossegue até que ocorra a expulsão de metade dos cromossomos homólogos, gerando duas células haploides: uma menor, o primeiro corpúsculo polar, e outra maior chamada de ovócito secundário, sendo que esta última dá continuidade à divisão meiótica até a fase de metáfase II, onde mais uma vez fica retida (SIRARD, 2001). Caso ocorra a fecundação, o ovócito é induzido a terminar a segunda divisão meiótica (KUBELKA et. al, 2000) resultando na liberação do segundo corpúsculo polar e formação dos pró-núcleos feminino e masculino, os quais sofrem singamia (fusão),

dando origem a uma célula diploide chamada zigoto. Entretanto, se não for penetrado pelo espermatozóide, o ovócito irá se manter em metáfase II até sua degeneração (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A maturação citoplasmática inclui várias alterações intracelulares, entre elas estão a redução do tamanho e migração das mitocôndrias e complexo de Golgi em direção ao núcleo, assim como o aumento na quantidade e o deslocamento dos grânulos corticais para a região adjacente à membrana plasmática para que eles consigam atuar sobre a zona pelúcida durante a fase de fecundação e assim impedir a polispermia (HYTTEL et al., 1997; LIU, 2011; MAO et al., 2014).

Nesse processo também há a transcrição de RNA mensageiro (RNAm) materno, que permanece armazenado em sua forma inativa, sendo gradualmente ativado e traduzido em proteínas essenciais para maturação, fecundação, formação dos pró-núcleos e início da embriogênese (SIRARD, 2001). Dessa forma, durante a maturação citoplasmática também é observada uma elevada síntese e acúmulo de proteínas (RIBEIRO, 2020), bem como mudanças na produção de determinadas proteínas que regulam a retomada da meiose (GONÇALVES, FIGUEIREDO E FREITAS, 2002), evidenciando assim a importância da capacidade do ovócito de estocar e ativar os RNAm para aquisição de sua competência (ADONA et. al, 2008).

Além desses eventos, ocorre a produção e acúmulo de ácido hialurônico entre as células adjacentes ao ovócito, levando à expansão das células do cumulus (CCs) (GONÇALVES, FIGUEIREDO E FREITAS, 2002) que, além de ser essencial para a captação do complexo cumulus-oophurus (CCO) pelas fímbrias do oviduto após a ovulação, também exerce importante papel na retomada da meiose, uma vez que destrói as junções tipo GAP impedindo assim que fatores inibidores de meiose cheguem até o ovócito (DEKEL, 1996).

Apesar de serem eventos distintos, falhas na maturação nuclear e citoplasmática ou a assincronia entre elas impossibilitam o ovócito de completar sua maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial, o que afeta a taxa de blastocistos (GILCHRIST & THOMPSON, 2007).

3.2. COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA

A capacidade do ovócito de passar pela maturação, fecundação monospérmica e se desenvolver até a fase de blastocisto é chamada de competência

ovocitária (FARIN et al., 2007). Como apenas ovócitos competentes são capazes de completar sua maturação e gerar blastocistos viáveis (DODE et al., 2006) essa característica é tida como um fator limitante para a eficiência da PIVE (GILCHRIST & THOMPSON, 2007). A competência ovocitária é adquirida pelo ovócito de forma gradativa através de alterações nucleares e citoplasmáticas que ocorrem ao longo da foliculogênese, durante a fase final do crescimento folicular (mais especificamente no período de dominância) e da maturação ovocitária (DIELEMAN et al., 2002; DODE et al., 2006).

Ao longo da fase de crescimento o ovócito aumenta de tamanho, adquirindo a capacidade de retomar a meiose logo após o surgimento do antro, porém permanece no estágio de vesícula germinativa (VG) até a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH (BEVERS & IZADYAR, 2002). Por existir uma correlação entre o tamanho do folículo e o grau de competência ovocitária, (DIELEMAN et al., 2002; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005) os ovócitos oriundos de folículos maiores (> 6mm) possuem uma melhor capacidade de concluir o desenvolvimento embrionário em relação à ovócitos vindos de folículos menores (2 - 3mm) (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al, 1994). Porém, é somente no lapso temporal entre a dominância folicular e o período que antecede o pico pré-ovulatório de LH que o ovócito passa pelo processo de capacitação ovocitária, adquirindo características necessárias para sobreviver ao longo da maturação, fecundação e embriogênese. (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Outro fator determinante para a competência é a capacidade do ovócito produzir e armazenar RNAm e proteínas maternas ao longo do seu processo de crescimento e maturação citoplasmática, já que os estoques dessas moléculas são vitais para o desenvolvimento até que o embrião seja capaz de expressar seus próprios RNAm de forma independente, momento este denominado como transição materno zigótica (TMZ) (RODRIGUEZ & FARIN, 2004). A capacidade de reativar os RNAm estocados também é essencial para que o ovócito seja considerado competente já que depois de produzidas essas moléculas são armazenadas e mantidas em sua forma inativa até serem requisitadas para a produção de proteínas ao longo da maturação e embriogênese inicial (SIRARD, 2001).

3.3. RETOMADA DA MEIOSE: AMPc e GMPc

O fator responsável por manter os ovócitos retidos no estágio de diplóteno da prófase I até o final do crescimento folicular é a elevada concentração intraovocitária de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (TRIPATHI et al., 2010). As altas concentrações de AMPc são responsáveis por manter a parada meiótica, enquanto a redução dos seus níveis está associada ao reinício da meiose (CONTI et al., 2002). O controle do AMPc intraovocitário é realizado através da ação conjunta de duas enzimas: Adenil ciclase (AC) e fosfodiesterase (PDE), que são responsáveis pela síntese e degradação do AMPc, respectivamente (CONTI et al., 2002). Entre as PDEs, se destacam a fosfodiesterase 3 (PDE3), que age especificamente no ovócito (NOGUEIRA et al., 2003; TRIPATHI et al., 2010), e a fosfodiesterase 4 (PDE4), que atua no metabolismo do AMPc nas células da granulosa (TSAFRIRI et al., 1996).

O AMPc que mantém a meiose retida é produzido tanto pelo ovócito quanto pelas células do cumulus (SIRARD & BILODEAU, 1990; RICHARD & SIRARD, 1996a,b; TRIPATHI et al., 2010), sendo que este último é transportado para dentro do ovócito através de junções comunicantes chamadas de junções GAP (SIRARD E BILODEAU, 1990; RICHARD E SIRARD, 1996a,b). Quando presente em altos níveis dentro do ovócito, o AMPc promove a ativação de uma proteína denominada de quinase A (PKA), que por sua vez, impede a ativação do fator promotor de meiose (MPF), responsável pelo início da maturação. Dessa forma, o ovócito permanece retido na fase de VG (KRISCHEK & MEINECKE, 2002).

Outra molécula relevante para a manutenção dos ovócitos na fase de VG é a guanosina monofostato cíclica (GMPc), produzida pelas células da granulosa e da teca, e transportada para dentro do ovócitos através das junções GAP, onde tem a função de inibir a ativação da PDE3A e, dessa forma, impedir a degradação do AMPc intraovocitário (CONTI et al., 2002; NORRIS et al., 2009; SUN et al., 2009).

Em condições fisiológicas, a saída do estágio de diplóteno da prófase I é desencadeada pela ação de hormônios gonadotróficos, especialmente o hormônio luteinizante (LH), (TRIPATHI et al., 2010), enquanto na PIVE a retomada da meiose é provocada pela remoção abrupta do ovócito do ambiente folicular (TRIPATHI et al., 2010).

In vivo, o LH se liga aos seus receptores presente nas células da granulosa e induz a produção de AMPc através da via adenilciclase (AC). O aumento do nível de AMPc estimula a atividade da proteína quinase A (PKA) e, conseqüentemente, a produção de fator de crescimento epidermal (EGF) pelas células da granulosa e do cumulus (NORRIS et al., 2009). Os estímulos provocado pelos EGFs levam ao aumento na transcrição de genes envolvidos na expansão das CCs, induzindo-as a sintetizar ácido hialurônico e, assim, promovendo sua expansão (OCHSNER et al., 2003; ASHKENAZI et al., 2005). Além disso, ao serem liberados, esses fatores se ligam aos receptores de EGF (EGFR) localizados nas CCs, estimulando a atividade da proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) (FREIMANN et al., 2004; ASHKENAZI et al., 2005; CONTI et al., 2006). Esses acontecimentos culminam na ruptura das junções comunicantes entre as células do cumulus e ovócito (GAP), bloqueando o transporte de AMPc e GMPc para dentro dele. A redução do nível de GMPc no ovócito ativa a PDE3A, que reduz ainda mais o nível de AMPc através de hidrólise. A redução do nível de AMPc intraovocitário inativa a PKA, de forma que o MPF também é ativado, induzindo o reinício da meiose (CHAUBE, 2002; TRIPHATI et al., 2010).

Já *in vitro*, a retomada da meiose ocorre de forma abrupta e espontânea pois a retirada do ovócito de dentro do folículo provoca a destruição das junções GAP, interrompendo a transferência de fatores que inibem a quebra da vesícula germinativa (GVBD) para dentro do ovócito. A queda de GMPc intraovocitário ativa a PDE3A causando uma redução nos níveis de AMPc, seguido de retomada da prófase I (TRIPATHI et al., 2010) e, conseqüentemente, do reinício da meiose. (SANCHEZ e SMITZ, 2012).

3.4. MATURAÇÃO IN VITRO

Após a recuperação dos CCO, os três processos biológicos subsequentes que ocorreriam *in vivo* são realizados no laboratório, compreendendo as etapas de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) (VARAGO et al., 2008).

Existem diversos sistemas de maturação para a PIVE de embriões bovinos; até o momento, diferentes meios e protocolos vêm sendo estudados e testados na MIV, tais como o Ham's F-12 e o *Tissue Culture Medium* 199 (TCM 199). Desses sistemas,

o TCM 199 é o mais utilizado pelos laboratórios de produção *in vitro*, sendo geralmente suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, hormônio folículo estimulante (FSH), LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (GANDHI et al., 2000). Além do meio, torna-se necessária a presença de uma estufa que mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, sendo que o período de maturação pode variar de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar com umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

O fator primordial para dar início ao processo de maturação nuclear *in vivo* é o pico pré-ovulatório de LH (MELLO et al.; 2016). Já no procedimento *in vitro*, após serem coletados, os ovócitos retomam a meiose de maneira espontânea e independente da maturação citoplasmática e do seu grau de competência (GILCHRIST & THOMPSON, 2007). Isso ocorre porque durante a aspiração há a perda do ambiente folicular, fazendo com que o ovócito perca o acesso a fatores bloqueadores da maturação nuclear (CROCOMO et al., 2011).

Um dos fatores que difere a MIV da maturação *in vivo* é a coleta de ovócitos de folículos de tamanho pequeno a médio (1 - 3 mm e 3,1 – 6 mm, respectivamente) que ainda não completaram o processo de aquisição de competência, iniciando sua maturação meiótica sem possuir toda a maquinaria molecular e citoplasmática necessária para passar pela embriogênese inicial, o que compromete o potencial de desenvolvimento dos embriões gerados *in vitro* (GILCHRIST & THOMPSON, 2007).

Além disso, com a retomada da meiose há o início da maturação nuclear associada ao bloqueio da maturação citoplasmática e da transcrição de RNAm materno (LONERGAN et al., 2003), o que leva vários dos ovócitos coletados a iniciarem a maturação nuclear sem possuir RNAm e proteínas armazenadas em níveis suficientes para concluir a maturação, embriogênese inicial e TMZ, prejudicando sua competência (THOMAS, ARMSTRONG & GILCHRIST, 2004). Dessa forma, é possível perceber que a baixa competência dos ovócitos utilizados na PIVE e a baixa taxa de produção de blastocistos *in vitro* se dá principalmente por uma assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática (SHU et al., 2008).

3.5. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)

O GH ou somatotropina é uma glicoproteína que desempenha um papel crítico na regulação do crescimento celular, desenvolvimento e metabolismo em vários tecidos (BARBOSA, 2015; CHANG et al., 2022). É sintetizado pelos somatotrófos no lobo anterior da hipófise, também conhecida como adenohipófise, e secretado na circulação para ligar-se a receptores nos tecidos alvos (BARBOSA, 2015) e, apesar de não ser um hormônio reprodutivo, sua atuação sobre o sistema reprodutor é muito importante para o desenvolvimento dos folículos ovarianos, esteroidogênese e maturação de ovócitos (CHANG et al., 2022).

Uma das funções do GH no ovário é estimular a produção de esteroides, o que pode ser feito de forma direta ou através da potencialização da atividade das gonadotrofinas, atuando na secreção e na ação do LH e do FSH. Além disso, o GH reduz os níveis de apoptose em folículos pré-ovulatórios de roedores (DANILOVICH et al., 2000), além de potencializar a sensibilidade e a capacidade de resposta das células da granulosa à estimulação por gonadotrofinas, interferindo no desenvolvimento folicular (CHANG et al., 2022).

3.4.1. RECEPTORES DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GHR)

Os GHR são proteínas transmembrana que possuem um domínio extracelular de ligação ao ligante, uma porção transmembranária e um domínio intracelular citoplasmático, necessários para a transdução de sinal intracelular (SILVA, FIGUEIREDO & VAN DEN HURK, 2009; BARBOSA, 2015).

Os receptores estão presentes em quase toda a fase de desenvolvimento folicular ovariano, sendo distintas as quantidades de GHR e RNAm nos folículos primordiais, primários e em estágios avançados de desenvolvimento (KOLLE et al., 1998). São encontrados de forma abundante nas CCs, mas também estão presentes na membrana citoplasmática e nuclear do ovócito (IZADYAR et al., 1997b), corpo lúteo (CL), oviduto, endométrio e miométrio (SILVA, FIGUEIREDO & VAN DEN HURK, 2009; BARBOSA, 2015).

Durante algum tempo foi questionado se nos bovinos o GH realizava seus efeitos diretamente ou se eram mediados pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) (LORENZO et al., 1994). No entanto, foi demonstrado que na vaca o efeito estimulador do GH na maturação ovocitária é uma ação direta do próprio

hormônio e não um processo mediado pelo IGF-I, pois a adição de um anticorpo direcionado contra o IGF-I não afetou o efeito estimulatório do GH na maturação nuclear nem o grau de expansão das CCs, ao mesmo tempo que suprimiu completamente a ação do IGF-I (IZADYAR et al., 1997b).

3.4.3. GH NA MATURAÇÃO IN VITRO

Vários pesquisadores conduziram estudos testando o uso do GH na PIVE com o intuito de melhorar a eficiência dessa técnica. A partir disso, foi possível observar que a presença do GH no meio MIV promove melhorias na qualidade do ovócito, levando a uma maior velocidade de conclusão da maturação citoplasmática e nuclear (BARBOSA, 2015), sendo essa última expressa pela redução do número de ovócitos em VG e aumento da quantidade em metáfase II, gerando assim ovócitos mais competentes (IZADYAR et al., 1996; IZADYAR et al., 1998; KOLLE et al., 1998; SILVA, FIGUEIREDO & VAN DEN HURK, 2009). Além disso, a presença de GH promove uma melhora na sincronia entre os dois tipos de maturação ovocitária (IZADYAR et al., 1997b).

Izadyar et al. (1996; 1997b) e Moreira et al. (2002) perceberam que a adição de GH ao meio de maturação melhora a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos bovinos amadurecidos, o que foi evidenciado pelo aumento da formação de blastocistos após a FIV em relação aos ovócitos não tratados. Além disso o GH também promove o aumento da taxa de clivagem e conseqüentemente da taxa de produção de embriões (IZADYAR et al., 1998; MOREIRA et al., 2002).

O GH também promove a expansão das CCs bovinas (IZADYAR et al., 1996; IZADYAR et al., 1998; KOLLE et al., 1998; KOLLE et al., 2002; BEVERS & IZADYAR, 2002).

Shirazi et al., (2010) observou que a presença do GH durante MIV (16h e 24h) de ovócitos ovinos levou a um aumento significativo da porcentagem de ovócitos em MII em comparação ao controle (44,7% e 83,1% vs. 32,6% e 73,6%, respectivamente), assim como das taxas de blastocisto (31,3% vs. 11,4%, respectivamente).

A suplementação do meio MIV também demonstrou efeitos positivos em éguas, onde promoveu aceleração da maturação nuclear e citoplasmática, aumentando a

proporção de ovócitos que alcançaram a MII em comparação com os maturados sem GH (PEREIRA et al, 2013).

Já em humanos, a taxa de fertilização (GH: 73,1 vs. Controle: 60,3%) e a taxa de blastocisto (GH: 25,0 vs. Controle: 15,5%) tiveram uma tendência crescente no grupo de ovócitos suplementado com GH a em comparação ao controle (LI et al., 2021).

3.4.3. RELAÇÃO ENTRE O USO DE GH NA MIV E COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA

Nos experimentos de Caixeta et al. (2009) e Cordeiro (2011) observou-se que a quantidade de transcritos de GHR nas CCs de ovócitos bovinos aumentou de forma diretamente proporcional ao tamanho do seu folículo de origem, sendo maior em CCs de folículos $\geq 8,1$ mm, e que ovócitos provenientes de folículos maiores eram mais competentes que os de folículos menores (CAIXETA et al., 2009). Baseado nisso, esses autores defenderam a possibilidade de existência de correlação entre a competência ovocitária e uma maior expressão do gene GHR nas CCs, sugerindo que o GH tem um importante papel na aquisição de competência pelo ovócito, o que vem sendo confirmado através de resultados obtidos em experimentos recentes.

No ano de 2015, com o intuito de validar os perfis de expressão de genes potencialmente relacionados à competência ovocitária, Kussano e colaboradores quantificaram os transcritos de alguns genes candidatos a marcadores moleculares de competência presentes em CCs bovinas de CCOs comprovadamente capazes ou não de produzir embrião. Ao final desse experimento foi observado que a abundância relativa do gene GHR foi maior nas CCs de ovócitos que deram origem à blastocisto expandido no dia 7 (D7) quando comparado com o grupo que não clivaram após a FIV (KUSSANO, 2015; KUSSANO et al, 2016).

Em 2021, Kussano mostrou que a quantidade de transcritos do GHR é mais elevada nas CCs de ovócitos, sejam eles maduros ou imaturos, capazes de formar um embrião ao final da PIVE em relação aos ovócitos incapazes de alcançar essa fase de desenvolvimento.

Esses resultados evidenciam uma tendência dos níveis de transcritos de GHR serem mais elevados em CCs de CCOs recuperados de uma população de folículos mais competentes, o que corrobora com os trabalhos desenvolvidos por Caixeta et al. (2009) e Cordeiro (2011).

Nos experimentos de Izadyar et al. (1997 a,b) e Bezers & Izadyar (2002) foi possível observar que o efeito benéfico do GH na maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* ocorreu na presença das CCs. Isso reforça a ideia de que a ligação do GH ao seu receptor produza um sinal que é transferido para os ovócitos, estimulando algum mecanismo envolvido na aquisição de competência, sendo possível que essa sinalização tenha um papel importante durante o estágio final do desenvolvimento folicular (CAIXETA et al., 2009; KUSSANO, 2015).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que o GH é um importante regulador da função ovariana e que ao ser utilizado na fase de MIV promove diversos efeitos que corroboram com a maturação e competência ovocitária, sendo esses efeitos exercidos através das CCs e mediados pelos GHR presentes nessas células.

Além disso, os estudos apresentados ao longo da revisão forneceram evidências de que o GH pode ser de grande importância para o processo de aquisição de competência ovocitária, o que ajuda a consolidar a ideia de que a suplementação do meio MIV com esse hormônio pode levar a uma produção de ovócitos mais competentes e aptos a um desenvolvimento embrionário adequado, servindo como uma alternativa para melhorar as taxas embrionárias da PIVE.

Dessa forma, é recomendado a realização de mais estudos e experimentos voltados para a aquisição de um maior entendimento sobre o papel fisiológico do GH no processo de maturação ovocitária e como ele se comporta durante a MIV de ovócitos competentes e incompetentes. Pois essas informações podem ajudar na identificação de possíveis alterações a serem realizadas no sistema de MIV para que os ovócitos coletados possam ter a chance de se tornar mais competentes, melhorando a quantidade e qualidade de embriões produzidos pela PIVE.

REFERÊNCIAS

- ADONA, P.; DE BEM, T.; MESQUITA, L.; ROCHETTI, R.; LEAL, C. Embryonic Development and Gene Expression in Oocytes Cultured In Vitro in Supplemented Pre-Maturation and Maturation Media. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 46, no. 1, p. e31–e38, Feb. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01618.x>.
- ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, vol. 146, no. 1, p. 77-84, Jan. 2005. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0588>.
- BARBOSA, L. A. B. *Produção de embriões in vitro com adição de hormônio de crescimento bovino (bGH) ao meio de maturação*. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2015. Disponível em: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=2475710.
- BEVERS, M. M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 197, no. 1–2, p. 173–178, Nov. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00270-8).
- BLANCO, M.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO, E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, vol. 6, no. 7, p. 155–165, 2011. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/BMBR>.
- CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, vol. 21, no. 5, p. 655-664, jan. 2009. <https://doi.org/10.1071/RD08201>.
- CHANG, C.-W.; SUNG, Y.-W.; HSUEH, Y.-W.; CHEN, Y.-Y.; HO, M.; HSU, H.-C.; YANG, T.-C.; LIN, W.-C.; CHANG, H.-M. Growth hormone in fertility and infertility: Mechanisms of action and clinical applications. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 13, 14 Nov. 2022. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1040503>.
- CORDEIRO, D. M. *Identificação de marcadores moleculares para a competência ovocitária em células do cumulus bovinas*. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/10674>.

CROCOMO, L.; MARQUES, F. C.; DA CRUZ, L. A., F.; DIMAS, B. S. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, vol. 18, no. 4, p. 542-552, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/141245>.

CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F.; MEHATS, C.; CHUN, S. Y.; HORNER, K. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 187, p. 153–159, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00686-4).

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.-Y.; SU, Y.-Q. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. **Molecular Endocrinology**, vol. 20, no. 4, p. 715–723, 1 Apr. 2006. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0185>.

DANILOVICH, N. A.; BARTKE, A.; WINTERS, T. A. Ovarian Follicle Apoptosis in Bovine Growth Hormone Transgenic Mice. **Biology of Reproduction**, vol. 62, no. 1, p. 103–107, 1 Jan. 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.103>.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, vol. 1, no. 2, p. 81-88, 1996. <https://doi.org/10.1530/revreprod/1.2.82>.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A. M.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, vol. 57, no. 1, p. 5–20, Jan. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00655-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00655-0).

DODE, M. A. N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.-A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, vol. 73, no. 3, p. 288–297, Mar. 2006. <https://doi.org/10.1002/mrd.20427>.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L.; SISCO, B.; SOMERS, J.; SMITH, C. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocytes. **Theriogenology**, vol. 68, p. S84–S90, 1 Sep. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.016>.

FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E.; HOCKNEY, J. E.; HERRICK, J. R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-

mediated oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, vol. 98, no. 1–2, p. 97–112, Mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.007>.

FREIMANN, S.; BEM-AMI, I.; DANTES, A.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 324, no. 2, p. 829-834, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.129>.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, vol. 98, no. 1-2, p. 39-55, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.011>.

GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, vol. 15, no. 2, p. 395–401, Mar. 2000. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.395>.

GILBERT, I.; ROBERT, C.; DIELEMAN, S.; BLONDIN, P.; SIRARD, M.-A. Transcriptional effect of the LH surge in bovine granulosa cells during the peri-ovulation period. **Reproduction**, vol. 141, no. 2, p. 193–205, Feb. 2011. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0381>.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, vol. 67, no. 1, p. 6–15, Jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027>.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2. ed. São Paulo: Varela, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. B.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 31, no. 2, p. 212-217, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/212.pdf>.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, vol. 33, no. 2, p. 82-94, abr./jun. 2009. Disponível em: <http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag82-94.pdf>.

GUIMARÃES, A. L. S. *Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2003. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/992779>.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7. ed. São Paulo: Monole, 2004.

HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, vol. 47, no. 1, p. 23- 32, 1 Jan. 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6).

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, vol. 45, no. 3, p. 372–377, Nov. 1996.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199611\)45:3<372::AID-MRD15>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3<372::AID-MRD15>3.0.CO;2-0).

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Stimulatory Effect of Growth Hormone on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes Is Exerted through the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Signaling Pathway. **Biology of reproduction**, vol. 57, no. 6, p. 1484-1489, 1 Dec. 1997a. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1484>

IZADYAR, F.; VAN TOL, H. T. A.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, vol. 47, no. 2, p. 175–180, 7 Dec. 1997b.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199706\)47:2<175::AID-MRD8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199706)47:2<175::AID-MRD8>3.0.CO;2-J).

IZADYAR, F.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M. M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, vol. 51, no. 3, p. 339–345, Nov. 1998.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199811\)51:3<339::AID-MRD14>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199811)51:3<339::AID-MRD14>3.0.CO;2-Y).

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, vol. 73, no. 3–4, p. 129–140, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00131-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00131-8).

KOLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, vol. 59, no. 4, p. 836–842, Oct. 1998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.4.836>.

KOLLE, S.; BOIE, M. S.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis and expression of connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, vol. 68, no. 5, p. 1584-1589, 1 May. 2002. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010264>.

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**, vol. 62, no. 2, p. 292–302, 1 Feb. 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.292>.

KUSSANO, N. R.; LEME, L. de O.; DODE, M. A. N. Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle. **Animal Biotechnology**, vol. 29, p. 1–14, Oct. 2021. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.2019755>.

KUSSANO, N. R.; LEME, L. O.; GUIMARÃES, A. L. S.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, vol. 85, no. 6, p. 1167–1176, Apr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.033>.

KUSSANO, N. R. *Marcadores bioquímicos para a competência ovocitária em bovinos*. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

LEIVAS, G.F.; BRUM DOS SANTOS, D.; MEZZALIRA, A.; PILLA CÁCERES, L. F.; BERNARDI, M.L; RUBIN BATISTELLA, M. I.; SILVA MONDINO, C.A. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, vol. 34, no. 1, p. 219–224, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000100034>.

LIMA, J. M. P.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; BEZERRA, M. B. Progresso metodológico e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, vol. 38, no. 3, p. 135–140, Jul. 2014. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n3/pag135-140%20\(RB509\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n3/pag135-140%20(RB509).pdf).

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression

Patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 38, no. 4, p. 259–267, Aug. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>.

LI, Y.; LIU, H.; YU, Q.; LUI, H.; HUANG, Q.; ZHAO, S.; MA, J.; ZHAO, H. Growth hormone promotes in vitro maturation of human oocytes, **Frontiers in endocrinology**, vol. 10, p. 485, July. 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00485>.

LIU, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. **Reproductive biology and endocrinology**, vol. 9, p. 149, 2011. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-149>.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, vol. 37, no. 1, p. 48-53, Jan. 1994. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080370107>.

LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. **Reproduction**, vol. 101, no. 3, p. 697–701, 1 Aug. 1994. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010697>.

LUEDKE, F. E.; LAVACH, F. L.; CASSANTA, F. G.; NUNES, L. F. do N.; SCHLOTEFELD, C.; DE PAIVA, S. M.; DOS SANTOS, S. I.; NEVES, A. P. Aspectos da produção in vitro de embriões bovinos no Brasil – revisão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, vol. 25, no. 1/2, p. 120–132, 1 Oct. 2019. <https://doi.org/10.36812/paq.2019251/2120-132>.

MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; NING, W.; FAN, J. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**, vol. 28, no. 3, p. 284– 299, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.016>.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E. F.; DE SOUSA, S. L. G.; DE MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 40, no. 2, p. 58–64, Apr. 2016. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20\(RB602\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20(RB602).pdf).

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in

vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, vol. 57, no. 2, p. 895–907, Jan. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00694-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00694-X).

NOGUEIRA, D.; ALBANO, C.; ADRIAENSSENS, T.; CORTVRINDT, R.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P.; SMITZ, J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. **Biology of Reproduction**, vol. 69, no. 3, p. 1042–1052, Set. 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015982>.

NORRIS, R.P.; RATZAN, W.J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L.M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M.A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V.O. JAFFE, L.A. Cyclic GMP from the surrounding cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, vol. 136, no. 11, p. 1869-1878, Jun. 2009. <https://doi.org/10.1242/dev.035238>.

OCHSNER, S. A.; DAY, A. J.; RUGG, M. S.; BREYER, R. M.; GOMER, R. H.; RICHARDS, J. S. Disrupted function of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. **Endocrinology**, vol. 144, no. 10, p. 4376-4384, Jul. 2003. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0487>.

OYAMADA, T.; IWAYAMA, H.; FUKUI, Y. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**, vol. 12, no. 2, p. 143–150, 9 May. 2004. <https://doi.org/10.1017/S0967199404002710>.

PARK, J.-Y.; SU, Y.-Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.-L. C. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**. vol. 303, no. 65, p. 682-684, Jan. 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1092463>.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, vol. 31, no. 1, p. 63-67, Jan. 1992. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310111>.

PELLEGRINO, C. A. G. AVALIAÇÃO ECONOMICA DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS EM SISTEMA COMERCIAL. 2013. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte/MG, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SMOC-A39NL6>.

PEREIRA, G.R.; LORENZO, P. L.; CARNEIRO, G. F.; BALL, B. A.; PEGORARO, L. M. C.; PIMENTEL, C. A.; LIU, I. K. M. Influence of equine growth hormone, insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and

cytoskeleton morphology in equine oocytes. **Animal**, vol. 7, no. 9, p 1493–1499, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1017/S175173111300116X>

PONTELO, T. P. *ACETILAÇÃO DAS HISTONAS E SUA RELAÇÃO COM A AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA EM OVÓCITOS BOVINOS*. 2019. Tese (Doutorado em Fisiologia e Metabolismo animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/36740>.

RIBEIRO, T. I. S. *EFEITOS DO FSH, AMPc, hCG E COMBINAÇÕES, NO MEIO DE MATURAÇÃO E INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS*. 2020. Dissertação (Mestre em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, 2020. Disponível em: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/vie wTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=9811620.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation I: effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, vol. 54, no. 1, p. 16-21, Jan. 1996a. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.16>.

RICHARD, F.J.; SIRARD, M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: thecal cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, vol. 54, no. 1, p. 22-28, Jan. 1996b. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.22>.

SANCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. vol. 1822, no. 12, p. 1896-912, Dec. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>.

SATHANANTHAN, A. H. Ultrastructural Changes During Meiotic Maturation on Mammalian Oocytes: Unique Aspects of the Human Oocyte. **Microscopy Research and Technique**. vol. 27, p. 145-164, 1 Feb. 1994. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270208>.

SHIMADA, M.; NISHIBORI, M.; ISOBE, N.; KAWANO, N.; TERADA, T. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, vol. 68, p. 484-491, Nov. 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010082>.

SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, vol. 43, no. 5, p. 777-783, Nov. 1990. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.5.777>.

SHU, Y. -m.; ZENG, H. -t.; REN, Z.; ZHUANG, G. -l.; LIANG, X. -y.; SHEN, H. -w.; YAO, S. -z.; KE, P. -q.; WANG, N. -n. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, vol. 23, no. 3, p. 504–513, 1 Mar. 2008.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dem344>.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, vol. 71, no. 8, p. 1193–1208, May 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.015>.

SIRARD, M.-A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, vol. 55, no. 6, p. 1241–1254, Apr. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00480-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00480-0).

SIRARD, M.-A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, vol. 65, no. 1, p. 126–136, Jan. 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>.

SUN, Q.Y.; MIO, Y.L.; SCHATTEEN, H. Towards new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. **Cell Cycle** vol. 8, no. 17, p. 2741–2747, Sep. 2009. <https://doi.org/10.4161/cc.8.17.9471>.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**, vol. 223, no. 3, p. 592–600, Jun. 2010.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22108>.

TSAFRIRI, A.; CHUN, S. Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A. J.; CONTI, M. Oocyte Maturation Involves Compartmentalization and Opposing Changes of cAMP Levels in Follicular Somatic and Germ Cells: Studies Using Selective Phosphodiesterase Inhibitors. **Developmental Biology**. vol. 178, no. 2, p. 393–402, Sep. 1996.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0226>.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels1. **Biology of Reproduction**, vol. 70, no. 3, p. 548–556, 1 Mar. 2004.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021204>.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, vol. 63, no. 6, p. 1717–1751, Apr. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 32, no. 2, p.100-109, abr./jun. 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf>.