



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA

SÉRGIO HENRIQUE COSTA JÚNIOR

EFEITO DA ANGIOTENSINA (1-7) NA MATURAÇÃO E EMBRIÕES *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

SÃO LUÍS – MA

2020

SÉRGIO HENRIQUE COSTA JÚNIOR

EFEITO DA ANGIOTENSINA (1-7) NA MATURAÇÃO E EMBRIÕES *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução e Conservação Animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior

SÃO LUÍS – MA

2020

SÉRGIO HENRIQUE COSTA JÚNIOR

EFEITO DA ANGIOTENSINA (1-7) NA MATURAÇÃO E EMBRIÕES *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior – UEMA/CCA

Orientador

Prof.^a Dr.^a Alana Lislea de Sousa – UEMA/CCA

1º Membro Interno - PPGCA

Prof.^a Dr.^a Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco

2º Membro Externo - UFS

*“Dedico este trabalho a todos os pesquisadores
brasileiros que, apesar do cenário político
atual, proporcionam um avanço técnico-
científico grandioso ao nosso Brasil”*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo cuidado e empenho, por me suportar e tentar entender o estresse diário e por dar aquela força no proceder. À minha cadela, Fiona, que sempre me recebe com alegria quando chego à casa.

Aos meus primos, Letícia Fernanda e Fernando Soares, pelo incentivo, conversas e toda energia boa que me deram nesses dois anos de pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior, que esteve me acompanhando desde a minha primeira iniciação científica, obrigado pela oportunidade de aprender e poder levar o conhecimento obtido para outras pessoas. Um ciclo se concretiza e outro começará a partir de agora, obrigado por tudo até aqui.

A equipe do Laboratório de Reprodução Animal (LABRA-UEMA): Leandra, Júlia, Daniel, Victória, Naylla, Débora, Jandyana, Helen, Mikaelle, Carol e Lucas, meu agradecimento pela ajuda.

Aos bolsistas em iniciação científica que ajudaram a executar este projeto de pesquisa, em especial a Júlia Faconi e Daniel Brito que estavam sempre à disposição.

Ao Breno, ex-LABRA pela ajuda interwebzap.

A turma PPGCA pela boa convivência nesses últimos dois anos e, em especial, aos meus amigos de graduação, Larissa Fernanda e Leandro Veiga, que se tornaram também mestrandos e que estiveram dando apoio e servindo de divã durante a execução do experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa durante o mestrado.

À Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Abreu Silva por proporcionar a execução do experimento, sem sua ajuda nada disso seria possível, muito obrigado.

Aos laboratórios: LDI (Laboratório de Doenças Infecciosas) e LPMOL (Laboratório de Patologia Molecular), sob coordenação dos professores Helder Pereira e Alcina Neta, respectivamente, pelo fornecimento de insumos e maquinário essenciais para a execução do experimento.

À secretaria do PPGCA, Francisca – Frann, por ser sempre tão gentil e estar disposta a ajudar os alunos, sua ajuda teve grande importância até aqui.

Ao Matadouro Municipal, D.A. Vital, em especial ao Médico Veterinário e Responsável Técnico, Hélio Fernandes Alves Monteles, pela disponibilização dos materiais *post-mortem* para a realização do experimento.

Às amizades que deram toda sua audição e visão quando eu precisava desabafar ou pedir alguma ajuda holística num dia cinza: Adriano, Orlando, Leudson, Victória, Naylla...

E, por último, e não menos importante, aos podcasts Poc de Cultura, Mamilos, Imagina Juntas, Um milk-shake chamado Wanda, É noia minha? e Vamos falar sobre música? que viraram minhas fiéis companhias durante as idas e vindas da UEMA e, principalmente, nos momentos de tristeza quando o experimento não dava certo e me questionava o porquê de ‘estar’ e com toda a informação me fizeram ter calma e ser paciente.

Hoje é um grande dia, mais uma etapa que está concludo e o sentimento de gratidão transborda.

Obrigado!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

COSTA JR, S. H. Efeito da angiotensina (1-7) na maturação e embriões *in vitro* de oócitos bovinos. 2020. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2020.

RESUMO

A produção *in vitro* (PIV) está inclusa na terceira geração das tecnologias de reprodução assistida e consiste na interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo. Entretanto vários fatores intraovarianos que regulam as etapas de desenvolvimento, maturação folicular e ovulação são ainda desconhecidos e podem ser responsáveis por alguns insucessos de tais biotécnicas. Os peptídeos do Sistema Renina-Angiotensina, tais como a angiotensina (1-7), que já tiveram sua presença, produção e alguns efeitos descritos nos ovários) mas que apresentam ainda funções pouco esclarecidas. Novas perspectivas sobre os fatores que influenciam a qualidade dos embriões produzidos e os mecanismos envolvidos na maturação a partir da adição de diferentes concentrações de Angiotensina (1-7) na PIV da espécie bovina. Folículos ovarianos foram aspirados e os CCOs foram distribuídos entre quatro tratamentos: Controle (C), 10^{-1} (T1), 10^{-3} (T2), $10^{-5} \mu\text{M}$ (T3) de angiotensina (1-7) no meio de maturação *in vitro* para verificar os estágios de meiose e desenvolvimento embrionário. A adição do peptídeo angiotensina (1-7) no meio de maturação *in vitro* não proporcionou taxas superiores de metáfase II em relação ao grupo Controle. No desenvolvimento embrionário, a angiotensina (1-7) não melhorou a clivagem nem a quantidade de embriões totais, o grupo $10^{-1} \mu\text{M}$ proporcionou quantitativo superior de blastocistos iniciais. No entanto, mais análises são necessárias para elucidar as ações realizadas pela angiotensina (1-7) na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: Angiotensina (1-7). Maturação *in vitro*. Produção *in vitro*.

COSTA JR, S. H. Effect of angiotensin (1-7) on in vitro maturation and embryos of bovine oocytes. 2020. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2020.

ABSTRACT

In vitro production (IVP) is included in the third generation of assisted reproduction technologies and consists of the interaction between sperm and oocyte outside the female reproductive tract, with the formation of a new individual. However, several intraovarian factors that regulate the stages of development, follicular maturation and ovulation are still unknown and may be responsible for some failures of such biotechniques. Renin-Angiotensin System peptides, such as angiotensin (1-7), which have had their presence, production and some effects described in the ovaries) but still have poorly understood functions. New perspectives on the factors that influence the quality of the embryos produced and the mechanisms involved in the maturation from the addition of different angiotensin (1-7) concentrations in the bovine IVP. Ovarian follicles were aspirated and the COCs were distributed among four treatments: Control (C), 10-1 (T1), 10-3 (T2), 10-5 μ M (T3) angiotensin (1-7) in the maturation medium. in vitro to verify the stages of meiosis and embryonic development. The addition of angiotensin peptide (1-7) in the in vitro maturation medium did not provide higher metaphase II rates than the Control group. In embryonic development, angiotensin (1-7) did not improve cleavage or the amount of total embryos, the 10-1 μ M group provided superior amount of initial blastocysts. However, further analysis is needed to elucidate the actions performed by angiotensin (1-7) in the in vitro production of bovine embryos.

Keywords: Angiotensin (1-7). in vitro maturation. In vitro production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação esquemática da distribuição das organelas durante a maturação, fecundação oocitária, bem como a formação do zigoto. A) Progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de vesícula germinativa (VG) até MII e formação do zigoto. B) (Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2009).....**32**
- Figura 2.** Esquema geral do sistema renina-angiotensina. Eixo principal do sistema renina angiotensina clássico (negrito). ECA – enzima conversora de angiotensina, NEP – endopeptidase neutra, PCP – prolilcarboxipeptidase, PEP – prolilendopeptidase (Fonte: Feitosa et al., 2010).....**35**
- Figura 3.** Coloração dos oócitos bovinos com Hoescht-33342 para avaliação da maturação nuclear. A: Oóцит apresentando rompimento da vesícula germinativa, B: Oócio em estágio de Metáfase II, C: Não Identificado/ Oócio degenerado. Objetiva 20X.....**48**
- Figura 4.** Taxa de estágios de desenvolvimento embrionário bovino produzido in vitro com meio de maturação suplementado ou não com diferentes concentrações de angiotensina 1-7...**50**
- Figura 5.** Taxas de qualidade embrionária avaliados em graus de embriões bovinos com meio de maturação suplementado ou não com diferentes concentrações de angiotensina 1-7.....**51**
- Figura 6.** Taxas de estruturas degeneradas e não fertilizadas na produção in vitro de embriões bovinos com meio de maturação suplementado ou não com diferentes doses da angiotensina 1-7.....**52**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Qualidade morfológica dos complexos <i>cumulus-oócito</i> (CCOS) de fêmeas bovinas utilizadas na no processo de maturação <i>in vitro</i>	44
Tabela 2. Avaliação da maturação nuclear através da técnica de fluorescência HOESCHT-33342 de fêmeas bovinas utilizadas no processo de maturação <i>in vitro</i> tratados ou não com Angiotensina (1-7).....	45
Tabela 3. Taxa de clivagem dos embriões avaliados em D3 em relação ao total de CCOs que passaram pelo processo de cultivo <i>in vitro</i> nos grupos experimentais.....	49
Tabela 4. Taxa de embriões <i>in vitro</i> bovinos com suplementação ou não do meio de maturação com diferentes concentrações de angiotensina (1-7).....	50
Tabela 5. Taxa de eclosão dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> avaliados em D9 em relação ao total de blastocistos gerados a partir de diferentes concentrações de angiotensina (1-7).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Anáfase I
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang(1-7)	Angiotensina 1-7
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
BLI	Butirolactona I
Bl	Blastocisto
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	DNA Complementar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CCOS	Complexos <i>Cumulus</i> oócito
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CGP	Células Germinativas Primordiais
CL	Corpo Lúteo
CP	Corpúsculo Polar
DMPBS	Dulbecco Modified Phosphate Buffered Saline
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECA	Enzima conversora de angiotensina
eCG	gonadotrofina Coriônica Equina
hCG	gonadotrofina Coriônica Humana
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
ICSI	Intra Citoplasmatic Sperm Inject
GSH	glutationa

H	Hora
LABRA	Laboratório de Reprodução Animal
LH	Hormônio Luteinizante
M	Mol
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
MPF	Fator Promotor da Maturação
NI	Não identificado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K/Akt	Phosphoinositide 3-kinase protein kinase B
Pi	Peso Inicial
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
Pf	Peso Final
REL	Retículo Endoplasmático Liso
RNA	Ácido Ribonucleico
RVG	Ruptura da Vesícula Germinativa
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
SNK	Student-Newman-Keuls
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAO	Sistema Renina-Angiotensina Ovariano
TI	Telofase I
TE	Transferência de Embriões
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TQC	Totaly Quality Control

UEMA Universidade Estadual do Maranhão

VG Vesícula Germinativa

ZP Zona Pelúcida

LISTA DE SIMBOLOS

® Marca Registrada

% Porcentagem

°C Graus Centígrados

χ^2 Qui-quadrado

μL Microlitro

μm Micrômetro

μM Micromolar

μg Micrograma

CO₂ Dióxido de Carbono

O₂ Oxigênio

G Gauge

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

mg Miligramma

mm milímetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3. REVISAO DE LITERATURA	21
3.1 Oogênese.....	21
3.2 Foliculogênese.....	22
3.3 Maturação oocitária.....	24
3.3.1 Maturação Nuclear.....	24
3.3.2 Maturação Citoplasmática.....	26
3.3.3 Maturação Molecular.....	27
3.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	28
3.4.1 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	29
3.4.2 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	33
3.4.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	33
3.5 Sistema Renina-Angiotensina.....	34
3.5.1 Sistema Renina Angiotensina Ovariano.....	35
3.5.2 Angiotensina (1-7) e seu receptor MAS.....	36
3.6 Hoechst-33342.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Comitê de ética e Experimentação Animal.....	39
4.2 Obtenção dos ovários post-mortem.....	39
4.3 Punção folicular ovariana.....	39
4.4 Grupos Experimentais.....	40
4.5 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	40
4.5.1 Avaliação da maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	41
4.5.2 Coloração com Hoescht-33342.....	41
4.6 Produção <i>in vitro</i> (PIV).....	42
4.6.1 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	42
4.6.2 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	43

4.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

A preconização do incremento da produtividade da pecuária brasileira tem conduzido a aplicabilidade de várias biotecnologias de manejo reprodutivo (MELLO et al., 2016). Nesse contexto destaca-se a pecuária bovina como uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, sendo o rebanho composto de mais de 213,5 milhões de animais, o maior rebanho comercial do mundo (IBGE, 2018). O rebanho maranhense, segundo IBGE (2017), é constituído de 5,4 milhões de bovinos.

As tecnologias reprodutivas, tais como inseminação artificial (IA) ou inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE), sêmen sexado, criopreservação de gametas, clonagem, transgênicos, a produção *in vitro* (PIV) vêm sendo utilizadas com sucesso nos rebanhos bovinos, que apresenta um baixo número de descendentes e longo intervalo de gerações (MELLO et al., 2016) com o intuito de maximizar a intensidade dos programas de melhoramento genético (CÓRDOVA et al., 2011).

A produção *in vitro* (PIV) está inclusa na terceira geração das tecnologias de reprodução assistida (BERTOLINI E BERTOLINI, 2009) e consiste na interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo (MELLO et al., 2016). Ainda assim, o Brasil segue como referência no uso da PIVE, respondendo por 34,8% da produção global (Viana, 2018).

A maturação *in vitro* é uma etapa crítica e limitante da produção *in vitro* (PIV). Nesse estádio, os oócitos serão submetidos à maturação nuclear e citoplasmática, eventos vinculados às alterações ultraestruturas e moleculares imprescindíveis para o desenvolvimento adequado das etapas subsequentes (CROCOMO et al., 2011).

Entretanto vários fatores intraovarianos que regulam as etapas de desenvolvimento, maturação folicular e ovulação são ainda desconhecidos e podem ser responsáveis por alguns insucessos de tais biotécnicas. Os peptídeos do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), tais como a angiotensina (1-7), que já tiveram sua presença, produção e alguns efeitos descritos nos ovários (YOSHIMURA et al., 1996; COSTA, 2000; COSTA et al., 2003) mas que apresentam ainda funções pouco esclarecidas. A adição de angiotensina (1-7) em CCOs pode ativar a proteína PI3K/Akt levando a um aumento de estradiol via aromatase.

Apesar de resultados apontarem uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) na função ovariana, pouco se sabe até o momento sobre a sua função em espécies monovulares, como a bovina, e seu efeito nos oócitos recuperados e seu desenvolvimento *in vitro*.

Dessa forma poderiam ser oferecidas novas perspectivas sobre os fatores que influenciam a qualidade dos embriões produzidos e os mecanismos envolvidos na maturação a partir da adição de diferentes concentrações de Angiotensina (1-7) na PIV da espécie bovina, cuja importância econômica é significativa.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da adição de angiotensina (1-7) sobre os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) bovinos durante o processo de maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Angiotensina (1-7) sobre a maturação dos CCOs cultivados *in vitro*;
- Avaliar a taxa de maturação dos CCOs;
- Avaliação do estágio de cromatina dos oócitos maturados com Hoescht-33342;
- Taxa de clivagem, blastocistos e eclosão embrionária;
- Taxa de qualidade dos blastocistos;
- Taxa de estruturas degeneradas nos grupos tratados ou não com Ang (1-7).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Oogênese

A oogênese (ou ovogênese) pode ser definida como o conjunto de processos de diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a obtenção de um oócito secundário haploide fecundado (RUSSE, 1983), na qual tem início durante a vida fetal e continua após a puberdade. O oócito é resultante de dois tipos celulares: as CGP e as oogônias.

A formação dos gametas femininos em bovinos ocorre durante o período embrionário, próximo aos 40 dias de gestação (RUSSE, 1983). As CGP são oriundas do processo de gastrulação, a partir do endoderma é formado o saco vitelínico, do qual serão originadas as CGP que possuem mobilidade e característica invasiva.

Ainda na fase fetal, nas espécies bovina e ovina (FIGUEIREDO et al., 2008), migram para as gônadas em desenvolvimento, perdem suas características de motilidade e sofrem várias mitoses, podendo atingir cerca de dois milhões de células (ERICKSON, 1966).

Dentro do ovário, as CGP passam pela redistribuição das organelas citoplasmáticas e, com intensa atividade mitótica, transformam-se em oogônias (SADEU et al., 2006). As oogônias sofrem também sucessivas mitoses, o núcleo passa sucessivamente por quase todos os estágios pertencentes à prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), porém o primeiro processo meiótico é interrompido no estádio de diplóteno ou vesícula germinativa (VG) até a puberdade (FIGUEIREDO et al., 2008) sob estímulo de gonadotrofinas, sendo denominado de oócito (ou ovócito) primário.

No entanto, durante o crescimento das fêmeas, o oócito sofre uma intensa fase de crescimento, aumento da atividade transcripcional (síntese de RNA), acúmulo lipídico, absorção de nutrientes através da inter-relação com as células somáticas foliculares (ERICKSON, 1966).

A partir da puberdade, as ondas pré-ovulatórias do hormônio luteinizante (LH) proporcionam a retomada da meiose e o núcleo do oócito entra no processo de diacinese iniciando o rompimento da vesícula germinativa (RVG). Conclui-se, então, as fases subsequentes: metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), resultando na expulsão do primeiro corpúsculo polar (CP) e formação do oócito secundário.

Nesta fase, o oócito progredirá até a metáfase II sofrendo a segunda interrupção meiótica. No entanto, só retornará a meiose somente se for fecundado pelo espermatozoide, implicando na continuidade da passagem pelos estádios de anáfase II e telófase II, acarretando na liberação do 2º CP e da formação do oócito haploide fecundado (HOSHI, 2003). Caso não ocorra a fecundação, o oócito sofre degeneração.

3.2 Foliculogênese

As fêmeas bovinas são consideradas espécies poliéstricas mono-ovulatórias proporcionando a ovulação de um folículo ovariano ao final de cada ciclo estral (FORTUNE, 1994). A unidade funcional da gônada feminina que contém o gameta é o folículo que consiste numa ultraestrutura organizada constituída essencialmente pelo ovócito envolto por células somáticas (granulosa e tecais) e demarcado por uma membrana basal que os separa do estroma ovariano (HYTTEL, 2012).

A função do folículo ovariano consiste em manter o ovócito em ambiente ideal para manutenção da viabilidade, crescimento e maturação para tornar-se apto a fecundação, bem como produção hormonal (LANDIM-ALVARENGA, 2017).

É durante a fase de desenvolvimento folicular que o oócito adquire a competência para seu posterior desenvolvimento embrionário (HOSHI, 2003). Quando um determinado folículo deixa a reserva que reside no ovário, o mesmo se desenvolve até o processo de ovulação ou sofre atresia folicular (MAYER et al., 2004).

Os folículos podem ser classificados, em primordiais, primários, secundários, terciários e pré-ovulatório (FIGUEIREDO et al., 2008), assim como pré-antrais ou não cavitário e antrais (representam 90 a 95% da população folicular) ou cavitário, repleta de líquido folicular (BRISTOL-GOULD, 2006).

Os folículos primordiais são revestidos por células da pré-granulosas achatadas e definidos como uma reserva de folículos quiescentes que serão recrutados a cada ciclo estral para crescimento e posterior ovulação para toda a vida reprodutiva (HYTTEL, 2012). São os menores folículos do ovário, o núcleo oocitário é grande e posiciona-se centralmente (SILVA, 2005) e as organelas citoplasmáticas uniformemente distribuídas.

A partir do processo de ativação, ocorre a proliferação e diferenciação das células da granulosa de pavimentosa para cúbica (MOTA, 2013) ao redor do ovócito, transformando-se os folículos primários. Estes folículos crescem entre 30-120 μ m nas espécies domésticas, o oócito sofre mudanças nucleares e citoplasmáticas, incluindo o desenvolvimento dos grânulos corticais, que vão torná-lo competente para reiniciar a meiose e sustentar o desenvolvimento embrionário (HYTTEL, 2012) e com formação da zona pelúcida (ZP).

As células da granulosa proliferam em duas ou mais camadas de morfologia cúbica contornando o oócito, que passa a ser denominado de folículo secundário. Nestas estruturas, identifica-se uma expansão volumétrica do oócito, além da formação de grânulos corticais no ooplasma, o início da síntese de RNA e a responsividade às gonadotrofinas FSH e LH (MELLO

et al., 2013; AERTS E BOLS, 2010). Através do íntimo contato com as células da granulosa, ocorre a sintetização de glicoproteínas que são depositadas entre o oócito e as células formando a zona pelúcida.

Essa estrutura é transpassada por projeções das células da granulosa mais internas, as quais mantêm contato com o oócito por junções comunicantes, estas tornam possível a passagem de substâncias de baixo peso molecular (LANDIM-ALVARENGA, 2017) e fatores sinalizadores que são essenciais para a indução e regulação da diferenciação folicular e para o desenvolvimento de um oócito que será competente, podendo ser submetido à fertilização e à subsequente embriogênese (VAN DEN HURK et al., 2000).

As células do estroma ovariano que circundam as células da granulosa diferenciam-se mais internamente na teca interna, a partir do estroma intersticial, produtoras de esteroides, e mais externamente na teca externa, com função de suporte (HYTTEL, 2012). À medida que o desenvolvimento folicular ocorre, espaços preenchidos por líquidos aparecem entre as células da granulosa, os quais constituem-se em pequenas cavidades e depois coalescem, formando o antró folicular.

A partir da formação do folículo terciário ou cavitário, ovócito localiza-se em uma protusão das células da granulosa, o *cumulus oophorus*, que se estende ao antró, também chamada de células do *cumulus*. O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase dependente de gonadotrofinas (FSH e LH), proporcionando o folículo e o oócito desenvolvem até atingir sua estrutura específica através de mecanismos de crescimento, recrutamento, seleção e dominância folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Quando alcançam o desenvolvimento máximo, os folículos ovarianos são intitulados de pré-ovulatórios ou de graff, e provocam saliência na superfície do ovário (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017). Esse estádio caracteriza-se pela exibição de uma maior expansão da cavidade antral, decorrente do acúmulo de líquido folicular (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

Além disso, as tecas foliculares tornam-se mais espessas, enquanto a camada de células da granulosa da parede do folículo possui um aspecto delgado por não acompanhar o crescimento folicular (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

O processo de ovulação é iniciado a partir da onda pré-ovulatória de LH (Hormônio Luteinizante), esta fase final é denominada de maturação folicular e oocitária ou capacitação ovocitária (HYTTEL, 2012; MOTA, 2013), sendo essencialmente folículos pré-ovulatórios para a formação do corpo lúteo (CL) e manutenção da fertilidade (FORTUNE, 2003), por meio

de estímulos hormonais, os oócitos são ovulados em associação as células foliculares que o rodeiam (GARCIA E FERNÁNDEZ, 2012).

3.3 Maturação oocitária

A maturação oocitária compreende um conjunto de modificações bioquímicas e estruturais que objetivam a aquisição da competência completa dos oócitos, necessárias para a ocorrência da fecundação e manutenção do desenvolvimento embrionário inicial (GUEMRA et al., 2013). Nessa etapa do desenvolvimento embrionário, verifica-se a ocorrência das maturações nuclear e citoplasmática, uma complexa sequência de eventos fisiológicos que visão tornar o oóbito competente a ser fecundado (CROCOMO et al., 2011).

No núcleo, as alterações ocorridas durante o processo de maturação oocitária estão relacionadas à retomada meiótica, enquanto no citoplasma, processa-se a redistribuição das organelas citoplasmáticas, o acúmulo de mRNA, proteínas e fatores de transcrição necessários para o processo de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2011; SILVA et al., 2010).

3.3.1 Maturação Nuclear

A maturação nuclear refere-se à habilidade do núcleo em retomar a meiose, observada por microscopia através da extrusão do primeiro corpúsculo polar (MOGOLLÓN-WALTERO et al., 2013). A competência meiótica inicia-se em concomitância com o pico de LH, uma vez que, o aumento dos níveis de LH resulta na queda dos níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), a partir da dissociação das junções gap entre oócitos e células da granulosa e da redução da síntese do próprio AMPc por estas células (KAWAMURA et al. 2004). Consequentemente, ocorre desfosforilação e ativação do fator promotor da maturação (MPF).

Esse evento envolve a progressão do estádio de dictióteno da Prófase I, designado como vesícula germinativa (VG), até o estádio de metáfase II da divisão equacional meiótica (ARAÚJO et al., 2014). Em bovinos, os oócitos oriundos de folículos pré-antrais e antrais iniciais adquirem a capacidade da quebra da vesícula apenas quando atingem o diâmetro de 115 µm, no entanto, para aquisição capacidade de desenvolvimento embrionário, devem exibir um diâmetro superior a 120 µm. (CHAVES et al., 2010)

Os oócitos, mantidos no estádio de VG retomam a meiose, *in vivo*, pelo pico pré-ovulatório da gonadotrofina LH (OLIVEIRA, 2016). A retomada meiótica é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa (RVG), estádio em que ocorre dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina (CROCOMO et al., 2011).

Nesse processo, a célula germinativa avança da fase de prófase I, passando pelos estádios de metáfase I, anáfase I, telófase I e adentra na segunda divisão meiótica, onde estagna na fase de metáfase II. Ao término da primeira divisão meiótica, a citocinese assimétrica gera, além do oócito secundário, uma célula de tamanho reduzido, o primeiro corpúsculo polar (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

Na maturação nuclear, algumas proteínas desempenham funcionalidades importantes no prosseguimento adequado desse evento biológico, o fator promotor da maturação (MPF), um heterodímero constituído de duas subunidades, as proteínas P34^{cdc2} e ciclina B, é um dessas substâncias reguladoras (GONÇALVES et al., 2008). Essa cinase está envolvida na regulação da transição do ciclo celular de todas as células eucarióticas e sua ativação é necessária para a retomada meiótica em oócitos (LUCIANO et al., 2018).

Na maturação nuclear, o MPF está relacionado com a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear e a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas. (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Nos oócitos, a atividade da MPF aumenta no estádio da quebra da vesícula germinativa, apresenta alta atividade em metáfase I, a qual decresce em anáfase e telófase, mas alcança outro pico em metáfase II (CHAVES et al., 2010)

A Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (MAPK) é outro grupo de proteínas que estão envolvidas na progressão da meiose. Esses polipeptídios são ativados por sinais extracelulares e atuam através da modulação da atividade do MPF. Quando ativada, a MAPK promove a estabilização do MPF em oócitos através da inibição de alguns reguladores negativos e ativação da fosfatase Cdc25 (GOTTARDI E MINGOTI, 2009; MOGOLLÓN-WALTERO et al., 2013; LANDIM-ALVARENGA, 2014).

A Adenosina monofosfato cíclico (AMPc) desempenha um papel crítico na manutenção da parada meiótica em oócitos bovinos (LANDIM-ALVARENGA et al., 2014). Esse nucleotídeo é sintetizado pelas células da granulosa, em que o controle da produção é regulado por receptores ligados à proteína G, e transportado para o oócito através das junções Gap (LANDIM-ALVARENGA et al., 2014; CHAVES et al., 2010).

Sua concentração é regulada através de um equilíbrio existente entre as enzimas adenilciclase, envolvida na síntese de AMPc, e fosfodiesterase, que atua na degradação dessa molécula (LANDIM-ALVARENGA et al., 2014).

O declínio das concentrações de AMP cíclico provoca a desfosforilação e consequente ativação do MPF (LANDIM-ALVARENGA et al., 2014). Esse evento ocorre através de uma

onda de LH que resulta em rupturas nas junções comunicantes entre o oócito e as células da granulosa e da redução da sua produção pela granulosa (CHAVES et al., 2010).

3.3.2 Maturação Citoplasmática

Para o oócito estar apto a ser fecundado, deve ocorrer, além das divisões meióticas no núcleo celular, um conjunto de modificações no citoplasma do gameta (FERREIRA et al., 2008), estas mudanças incluem a redistribuição das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, síntese e estocagem de proteínas e RNA, maturação dos mecanismos regulatórios de Ca^{2+} , aumento da glutationa intracitoplasmática e atividade mitocondrial (ANEL et al., 2007).

Essas modificações ultraestruturais são necessárias para bloquear a poliespermia, promover a descondensação do espermatozoide no ooplasma, formar o pronúcleo após a fertilização, além de sustentar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2011).

As mitocôndrias são componentes celulares indispensáveis, envolvidas na produção da energia celular, na forma de ATP, necessária para a manutenção do desenvolvimento do oócito. Durante o processo de maturação oocitária, essas organelas são redirecionadas, através do citoesqueleto, para regiões que demandam maior quantidade de energia (FERREIRA et al., 2008). No estádio de VG, as mitocôndrias estão concentradas, predominantemente, na periferia, entretanto, na fase de metáfase II, ocupam uma posição mais centralizada na célula. (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

Sendo particularmente evidenciada em bovinos, os grânulos corticais migram da sua posição inicial (que antecede o pico pré-ovulatório de LH) sendo um grande aglomerado para regiões próximas à membrana plasmática para ocorrer a exocitose durante o processo de fertilização (HYTTEL, 2012). São organelas exclusivas dos oóцитos, geradas a partir do complexo golgiense, constituídas de diversas populações de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos (FERREIRA et al, 2008). Essas vesículas secretoras atuam na prevenção da poliespermia através de modificações na zona pelúcida por meio da liberação do conteúdo dos grânulos corticais na superfície externa, após a fecundação (FERREIRA et al., 2008).

No estádio de vesícula germinativa, os grânulos corticais são identificados como pequenos grupos no citoplasma celular, entretanto, no decorrer da divisão celular, são redirecionados para a periferia, próximos a membrana plasmática (GOTTARDI E MINGOTI, 2009; ARAUJO et al., 2014).

Em nível ultra estrutural e moleculares que ocorrem no citoplasma do oócito no estádio de VG até o fim da MII. Antes do pico de LH, o ovócito apresenta um retículo endoplasmático liso (REL) bem desenvolvido, associado a gotículas de lipídios e mitocôndrias, complexos de Golgi e aglomerados de grânulos corticais. O ovócito se comunica através de junções do tipo *gap* com as projeções das células do *cumulus*.

Cerca de 10 horas após o pico de LH, o ovócito reinicia a meiose e o envelope nuclear dissolve-se no REL fazendo com que o núcleo, isto é, a vesícula germinativa, se desarranje e os microtúbulos apareçam adjacentes aos cromossomos em condensação. O espaço perivitelínico desenvolve-se e no ovócito as mitocôndrias tendem a se posicionar em torno das gotículas de lipídios e os complexos de Golgi diminuem em tamanho, as junções tipo *gap* são parcialmente perdidas.

Aproximadamente 15 horas após do pico de LH, o ovócito atinge a fase de metáfase da primeira divisão meiótica (MI), o número e tamanho das gotículas de lipídios aumentam, as mitocôndrias organizam-se em torno das gotículas e esses conglomerados atigem distribuição mais uniforme no citoplasma. Ocorre o aparecimento de ribossomos em torno dos cromossomos, o tamanho dos complexos de Golgi diminui consideravelmente e as junções desintegram-se.

24h após do pico pré-ovulatório, o ovócito atinge a metáfase da segunda divisão meiótica (MII) e ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar, a maior parte dos grânulos corticais está distribuída ao longo da membrana plasmática. As gotículas de lipídeos e as mitocôndrias atingem uma posição centralizada no citoplasma, deixando a ZP quase desprovida de organelas, na qual as características mais proeminentes são os grandes conglomerados de REL e os complexos de Golgi estão praticamente ausentes (HYTTEL, 2012).

3.3.3 Maturação Molecular

A maturação molecular consiste na transcrição, armazenamento e processamento dos ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm), cópias de segmentos do DNA utilizadas na síntese de proteínas durante processo de maturação e nas etapas subsequentes do desenvolvimento embrionário (FERREIRA et al., 2008).

O reinício da meiose durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, a habilidade de produzir proteínas não é afetada, porém, ele perde a capacidade de transcrever (SIRARD & COENEN, 1994a; BLONDIN & SIRARD, 1995).

A transcrição e o armazenamento dessas moléculas ocorrem durante a foliculogênese, no período em que o núcleo oocitário permanece em estado quiescente (LANDIM-ALVARENGA et al., 2014).

A capacidade de transcrição somente será restabelecida após a ativação do genoma embrionário, durante uma fase chamada de “transição materno-zigótica” (MZT), que no bovino ocorre no quarto ciclo celular entre os estádios de 8 a 16 células (BREVINI GANDOLFI e GANDOLFI, 2001).

Durante a maturação oocitária, os cromossomos encontram-se condensados, o que inviabiliza a transcrição nuclear (FERREIRA et al., 2008). Para que a conservação dos RNAm se torne viável, essas moléculas transcritas durante a maturação molecular do oócito são acumulados em forma, transitoriamente estável, porém inativa, caracterizada pela presença da cauda poli-A curta (CROCOMO et al., 2011).

Essa peculiaridade evita degradação nucleolítica dos RNAm, para que possam ser utilizados em ocasiões adequadas, tendo em vista que transcritos que possuem caudas poli-(A) curtas, não são efetivamente traduzidos (FERREIRA et al., 2008).

3.4 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Desde a sua introdução no mercado brasileiro no final da década de 90, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) atingiu sua maturidade nos últimos anos, entre os anos de 2012 e 2013 tornou-se líder mundial no uso da biotécnica (GONÇALVES e VIANA, 2019).

Atualmente, o país assume uma posição de vanguarda chegando a marca de 20 anos dos primeiros registros de transferências embrionárias *in vitro* por empresas comerciais no Brasil (VIANA et al., 2017; 2018) atingindo 92% dos embriões *in vitro* (SBTE, 2019) produzidos não apenas em raças zebuínas de corte, mas também nos demais segmentos (GONÇALVES e VIANA, 2019). O Brasil é o líder mundial na produção de embriões *in vitro* representando aproximadamente 52% do mercado mundial.

A produção *in vitro* consiste na geração de embriões viáveis, obtidos a partir de matrizes de alto valor genético, por meio da mimetização do ambiente intrauterino em condições de laboratório. Entre os benefícios adquiridos por meio do desenvolvimento dessa biotecnologia reprodutiva está o aprofundamento do conhecimento acerca de processos bioquímicos e fisiológicos de diversas espécies, como a bovina (GONÇALVES et al., 2008).

Constitui-se nas seguintes etapas: aspiração folicular *post-mortem* ou *Ovum Pick-up* (OPU), maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Esta biotecnologia, tornou-se possível a produção de embriões bovinos sem levar em consideração

o estágio do ciclo estral das doadoras, podendo-se obter oócitos de fêmeas bovinas, para a realização desse procedimento, a partir dos 6 meses de idade, vacas prenhas até o terceiro mês de gestação, ou após o parto (VARAGO et al., 2008).

Apresentando vantagens como a inutilização de tratamento hormonal para a obtenção dos complexos *cumulus*-oócito (CCOS), emprego de sêmen criopreservado de reprodutores diferentes para a mesma doadora oocitária, assim como a viabilização de sêmen sexado na fertilização *in vitro*, permitindo o uso da biotécnica em escala comercial (RATH e JOHNSON, 2008; VARAGO et al., 2008; MELLO et al., 2016).

A coleta de oócitos viáveis constitui a fase inicial da produção *in vitro*. Essas estruturas podem ser adquiridas pela técnica *post-mortem*, a partir da punção folicular de ovários obtidos em abatedouro, ou *in vivo* por meio da laparotomia ou laparoscopia via flanco, por laparoscopia vaginal ou através da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (MELLO et al., 2016).

Após a realização desses procedimentos, os oócitos serão submetidos a três processos biológicos que são mimetizados em laboratório: a maturação *in vitro*, a fecundação *in vitro* e o cultivo *in vitro* (MELLO et al., 2016). A maturação extrafolícular envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, que visa tornar esse gameta apto a ser fecundado (MELLO et al., 2016).

A fecundação *in vitro* consiste na interação espermatozoide capacitado com o oócito para que viabilize a formação do zigoto (MELLO et al., 2016). O Cultivo *in vitro* ocorre após a fecundação, e consiste na transferência do zigoto recém-formado para um meio de cultivo que atenda suas necessidades nutricionais, possibilitando a ocorrência de inúmeras clivagens até se constituir em blastocisto (GARCIA E FERNÁNDEZ, 2012).

Em condições *in vivo*, aproximadamente 80% do oócitos ovulados desenvolvem-se até blastocisto, enquanto na PIVE apenas 40% atingem esse estágio (LONERGAN e FAIR, 2008). Tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo*, somente oócitos competentes podem retomar a meiose e adquirir a habilidade de serem fertilizados.

3.4.1 Maturação *in vitro*

No processo *in vitro* de embriões, que mimetiza as condições *in vivo*, a maturação *in vitro* (MIV) consiste num método eficiente para produção de unidades competentes para utilização em técnicas de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozoides (da sigla, em inglês, *intra cytoplasmic sperm injection* - ICSI) e clonagem (CHILD et al., 2001; MOTA, 2013) e pode sofrer influência de diversos

fatores, tais como: meio de cultivo, suplementação de proteínas, atmosfera gasosa (CO_2 e O_2), temperatura, umidade e tempo (GUEMRA et al., 2013; TIAN et al., 2014).

A MIV representa uma das etapas mais desafiadoras da PIV, uma vez que a tradução dos genes durante este período irá determinar a eficiência das modificações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, estando estas, por sua vez, ligadas a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o oócito apto a ser fecundado (HARTWIG et al., 2014).

Dessa forma, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena competência (ADONA; LEAL, 2006; GILCHRST; THOMPSON, 2007), ou seja, ainda não adquiriram a competência do citoplasma para suportar o desenvolvimento embrionário posterior (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). A maturação inadequada, quer seja do núcleo ou do citoplasma, impossibilita a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

O oócito, no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando o complexo *cumulus*-oócito (CCO), o conjunto celular próxima à zona pelúcida é denominado *corona radiata*, as células do *cumulus* participam de forma ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos.

In vivo, enquanto o oócito está dentro de um folículo não-ovulatório, o reinício da meiose não ocorre pela inibição de fatores presentes no fluido folicular, o mecanismo inicia-se logo após o pico pré-ovulatório de LH (SIRARD et al., 1998).

No processo *in vitro*, os oócitos retornam a meiose quando são removidos dos folículos ovarianos, o que se deve, provavelmente, à remoção do sinal inibidor proveniente do folículo, tornando importante o tempo entre a aspiração e o início da maturação *in vitro* para não comprometer a capacidade de fertilização do ovócito (SÁ et al., 2003) cultivados em meios específicos (MOTA, 2013).

Apesar do *cumulus* não serem essenciais para a maturação nuclear dos oócitos, a maturação citoplasmática é bastante comprometida na ausência desse tipo celular (GONÇALVES et al., 2008), melhores resultados de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário são alcançados na presença do *cumulus*, fato que evidencia a importância destas células somáticas.

Os oócitos bovinos utilizados na PIV são em geral aspirados do interior de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm, antes da divergência folicular. Folículos ovarianos menores que 2mm de diâmetro geralmente não são competentes para reiniciar a meiose, ao passo folículos maiores que 8mm geralmente não são competentes devido ao fato que já estão em processo de

atresia ou de maturação, comprometendo, então, sua viabilidade (PAVLOK et al., 1992; GONÇALVES, 2008).

Os oócitos possuem diferentes aspectos morfológicos que determinam sua viabilidade, várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos na tentativa de identificar os de maior viabilidade (LEIBFRIED e FIRST, 1979). Morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo com granulações finas, de coloração marrom e completamente envolvidos por várias camadas de células do cumulus dispostas de forma compacta (GONÇALVES et al., 2002).

Os oócitos destituídos da camada células do *cumulus*, absorvem aminoácidos, açucares e ribonucleosídeos de forma menos intensa quando comparados a oócitos envoltos por um extenso estratificado celular, por isso exibem um desenvolvimento reduzido na produção *in vitro* (GARCIA E FERNÁNDEZ, 2012).

A maturação *in vitro* leva a uma capacitação dos oócitos que passam por modificações nucleares e citoplasmáticas, rearranjo de organelas, expressão de genes que serão traduzidos em proteínas, expansão das células do *cumulus* que podem sofrer alterações pelas condições de cultivo (WATSON et al., 2000; WARZYCH et al., 2007).

In vitro, a expansão das células do cumulus é visível a partir das 12 horas de cultivo (SUTOVSKY et al., 1993). A presença considerável de glicosaminoglicanos nas células do *cumulus* impede a ação do estresse oxidativo dos radicais livres sobre os oócitos, evitando a redução na taxa de clivagem (LUVONI et al., 1996), e o choque térmico que bloqueia a síntese de proteínas (EDWARDS; HANSEN, 1997).

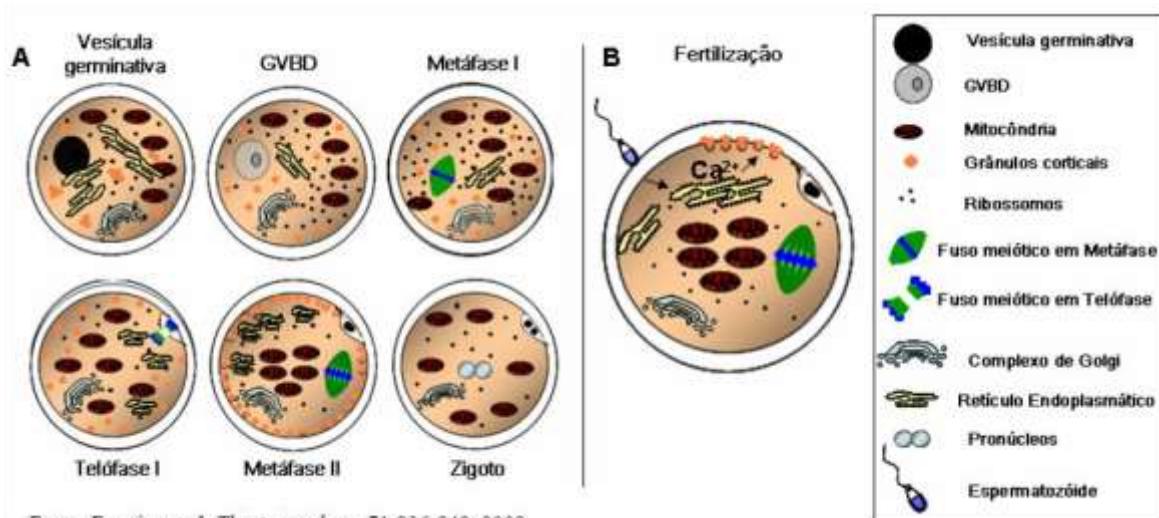
As células do *cumulus* deixam o aspecto de uma massa compacta, tornando-se uma estrutura dispersa, até a síntese da matriz intercelular mucoide. Tal processo é de suma importância para assegurar a maturação oocitária (YOKO & SATO, 2004)

Para reduzir os efeitos danosos gerados pela exposição ao ambiente atmosférico e aproximar-se das condições intrauterinas, a maturação *in vitro* é realizada em incubadoras a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada durante, aproximadamente, 24 horas (GONÇALVES et al., 2008).

Dessa forma, a suplementação de diferentes substâncias aos meios de maturação é uma prática rotineira nos laboratórios de PIV. Dentre as sustâncias mais empregadas, ganham destaque: piruvato de sódio, soro fetal bovino (SFB), soro de fêmea em estro, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol (E2), fatores de crescimento, cisteamina e glutamina (BERNADI, 2005).

Além disso, os meios de maturação são acrescidos com sistemas tampões para minimizar as variações de pH, que devem permanecer entre 7,3 e 7,5 (GOTTARDI E MINGOTI, 2009). A utilização do fluido folicular e substâncias, como Butirolactona I (BLI), hipoxantina e roscovitina, que inibem temporariamente a maturação até que se inicie o cultivo *in vitro* vêm sendo utilizados com sucesso (SÁ et al., 2003; GONÇALVES et al., 2008).

A maturação nuclear ocorre entre 16 e 24 horas após o início da MIV (Figura 1; COGNÉE et al., 2004). O período necessário para a maturação nuclear varia entre as espécies. Na espécie bovina, visualiza-se o RVG entre 7 e 12h após o reinício da meiose, a MI entre 12 e 15h, a AI e a TI de 15 a 18h e a MII de 18 a 24h.



Fonte: Ferreira et al. Theriogenology, 71:836-848, 2009

Figura 1. Representação esquemática da distribuição das organelas durante a maturação, fecundação oocitária, bem como a formação do zigoto. A) Progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de vesícula germinativa (VG) até MII e formação do zigoto. B) (Fonte: Adaptado de FERREIRA et al., 2009).

Para isso, é necessária uma incubadora que mantenham de forma exata a atmosfera gasosa e a temperatura. Os oócitos cultivados *in vitro* são afetados por diversas condições fisiológicas específicas, tais como a temperatura, o pH, a concentração de CO_2 e O_2 (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

No procedimento *in vitro*, os oócitos retornam à maturação meiótica espontaneamente após serem removidos artificialmente dos folículos ovarianos, devido à perda do ambiente natural de inibição meiótica. (GILCHRIST E THOMPSON, 2007; GOTTARDI E MINGOTI, 2009). Esse estado causa uma ruptura abrupta e prematura das junções gap dos complexos *cumulus*-oócito levando à perda de metabólitos benéficos (GILCHRIST E THOMPSON, 2007).

Além disso, verifica-se uma assincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática, que implica diretamente na redução das taxas de desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2011).

Taxas de blastocistos, prenhez e criopreservação obtidos a partir de oócitos maturados e fecundados *in vitro* são inferiores às obtidas nos sistemas *in vivo*, provavelmente pela incompleta maturação citoplasmáticas, o que reflete na capacidade de obtenção de unidades embrionárias (GONÇALVES et al., 2008). A maturação oocitária inadequada, seja no núcleo ou no citoplasma, compromete o processo de fecundação e desenvolvimento embrionário (LONERGAN et al., 2003).

A avaliação dessa competência pode ser realizada indiretamente pela habilidade do oóцит maduro em clivar-se até a obtenção de blastocisto (B1) após a ativação partenogenética (SCHWARZ, 2007). Outro parâmetro avaliativo indireto consiste na expansão das células do *cumulus*, o tempo de extrusão do 1º CP, aumento do espaço perivitelínico (KOTSUJI et al., 1994) e o uso de substâncias fluorescentes que permitem a visualização da configuração da cromatina dos oócitos.

3.4.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

Na fertilização *in vitro* são utilizados sêmen criopreservado que sofre um processo de descongelação e, posteriormente, é submetido ao gradiente Percoll. Esse processo tem como objetivo a separação dos espermatozoides vivos pós-descongelação. Embora outros sistemas possam ser usados, como o swim-up (GALLI, 1996).

A partir destes resultados, se determina a concentração de espermatozoides ideal para cada grupo de estruturas em meio sintético. Em geral, a concentração usada para a fertilização *in vitro* é de 2×10^6 sptz/mL, calculada de acordo com a motilidade e concentração da fração viva de espermatozoides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll (YOUNG, 1998). O período de incubação dos CCOs com os espermatozoides varia entre 20 a 22 horas.

3.4.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* consiste na etapa de desenvolvimento do oóцит fertilizado até o estádio de blastocisto (SANGILD et al., 2000).

É neste período de desenvolvimento que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estádio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI, 2003).

As condições de cultivo *in vitro* influenciam nos índices da produção de embriões, razão pela qual inúmeras pesquisas tem sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soros (NAGAI, 2001).

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no D7 (Dia 7) de cultivo analisando a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo feita a seleção e avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para criopreservação.

3.5 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) consiste num sistema de regulação da homeostase cardiovascular e equilíbrio hidroeletrolítico em diversas funções no organismo que envolve mecanismos sinalizadores intracelulares, mediação e receptores (Figura 2). Os componentes do SRA mais conhecidos são: renina, angiotensinogênio, angiotensina I, enzima conversora de angiotensina (ECA) e angiotensina II (FEITOSA et al., 2010).

No sistema renina-angiotensina, o angiotensinogênio, uma proteína plasmática que é produzida no fígado e precursora da angiotensina I (Ang I), que sofre catalisação por reação de conversão proteolítica pela renina, enzima produzida nas células justaglomerulares, para formar do Ang I. A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma enzima produzida no endotélio dos vasos pulmonares e tem a função de clivar a Ang I formando Ang II, o principal peptídeo do sistema renina-angiotensina. Esta última realiza suas funções por meio de dois receptores: AT₁ e AT₂ (BURRELL et al., 2004; FEITOSA et al., 2010).

Outros peptídeos do sistema renina-angiotensina, com funções ainda não bem esclarecidas, têm sido identificados, como: angiotensina III, angiotensina IV, angiotensina (1-5), angiotensina (1-9), angiotensina (1-7) e seu receptor Mas e outra enzima conversora de angiotensina II (DONOGHUE et al., 2000; SANTOS et al., 2008; FEITOSA et al., 2010).

Estudos recentes evidenciam a presença dos componentes do SRA nos órgãos reprodutivos, como útero, testículo e ovários, sugerindo a existência de sistemas renina-angiotensina locais (COSTA, 2000; COSTA et al., 2003).

Desta forma, é possível que, nestes órgãos os peptídeos integrantes deste sistema possam realizar funções diversas das desempenhadas pelo sistema renina-angiotensina sistêmico (FELIX et al., 1991), especialmente a Ang-(1-7; COSTA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2007; LEAL et al., 2009).

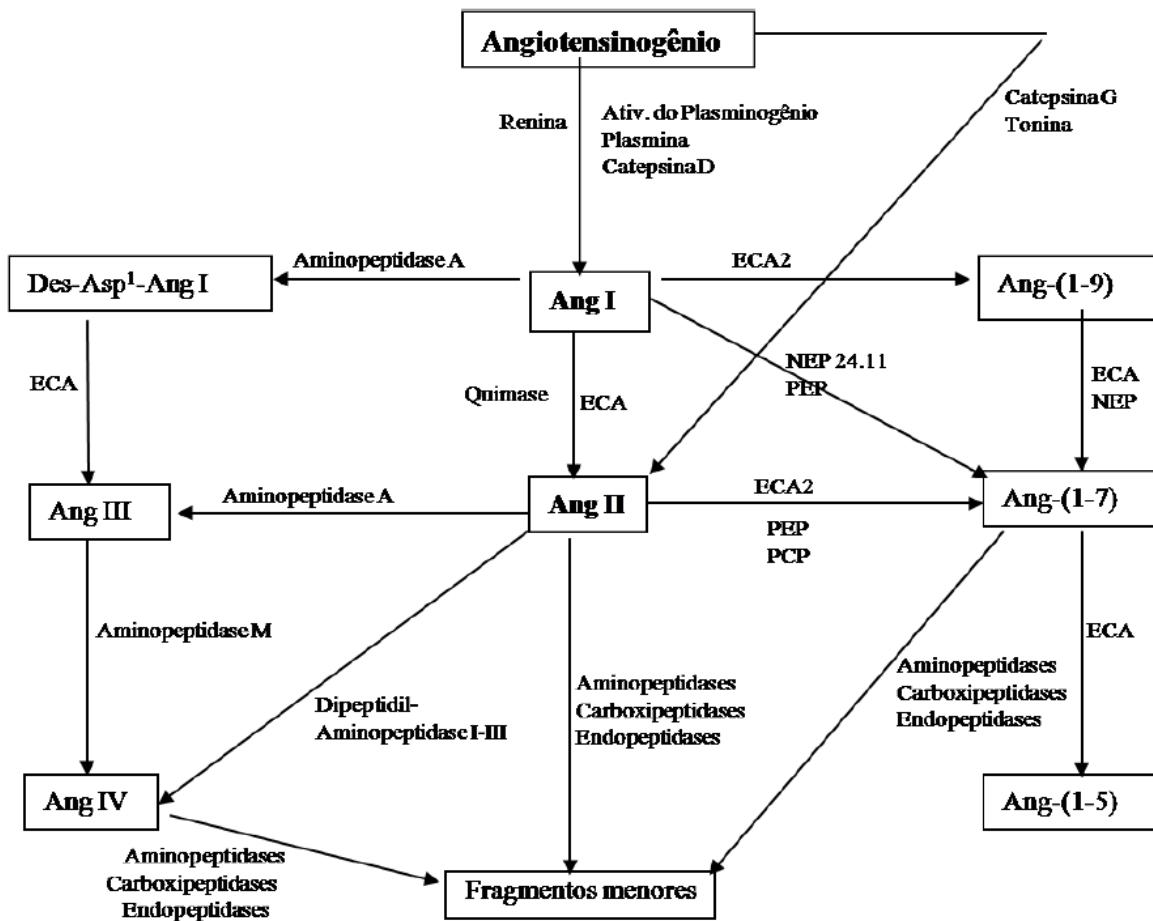


Figura 2. Esquema geral do sistema renina-angiotensina. Eixo principal do sistema renina angiotensina clássico (negrito). ECA – enzima conversora de angiotensina, NEP – endopeptidase neutra, PCP – prolilcarboxipeptidase, PEP – prolilendopeptidase (Fonte: Feitosa et al., 2010).

3.5.1 Sistema Renina-Angiotensina Ovariano

No ovário, autores relatam o envolvimento de um subsistema ovariano em funções como foliculogênese, atresia folicular, ovulação e concepção do corpo lúteo, tendo influência sobre as biotécnicas reprodutivas (YOSHIMURA et al., 1996; LI et al., 2004; OBERMÜLLER et al., 2004).

A angiotensina II foi descrita nas células da granulosa de ratas (PEPPERELL et al., 2006; FERREIRA et al., 2007) sendo relatada sua influência nos processos de maturação oocitária e ovulação. Em bovinos, a Ang II é indispensável nos momentos iniciais da cascata ovulatória induzida pelo LH (FERREIRA et al., 2007), além de possuir uma função vasoativa importante para a formação e regressão do corpo lúteo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004).

A adição de antagonista de Ang II (saralasina) provocou bloqueio da ovulação em ratas impúberes associado com a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG).

A angiotensina II estimulou significativamente a maturação meiótica do oócito na ausência das gonadotrofinas, sendo capaz de reverter o efeito inibitório do fator inibidor de meiose que está presente no líquido folicular (STEFANELLO et al., 2006). E seus receptores (AT1 e AT2) são expressos em ovários (KAKAR et al., 1992), folículos e corpo lúteo de vacas (SCHAUSER et al., 2001). GIOMETTI et al., (2006) relataram uma melhora na maturação nuclear de oócitos bovinos *in vitro*.

Entretanto, a inibição da produção de Ang-II por inibidor de ECA não altera a esteroidogênese ou a ovulação.

A enzima conversora de angiotensina (ECA) foi detectada no fluido folicular de bovinos (NIELSEN et al., 2002), ovários de ratas e superfícies dos oócitos e tubas uterinas (BRENTJENS et al., 1986) sendo a expressão desta enzima pode ser estimulada por agentes hipofisoides, como o eCG (PEREIRA et al., 2009).

3.5.2 Angiotensina (1-7) e o receptor MAS

Outros peptídeos gerados a partir da Ang I e Ang II, como a Ang-(1-7) (FELIX et al., 1991), também podem mediar as ações do SRA em diferentes processos fisiológicos (COSTA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2007).

A angiotensina (1-7) é um heptapeptídeo formada por sete aminoácidos (SILVA, 2008), composto de aspartato, arginina, valina, tirosina, isoleucina, histidina e prolina sendo um dos componentes do Sistema Renina Angiotensina que tem se destacado bastante nos últimos anos (COSTA, 2017).

No SRA a Ang I é convertida em Ang II pela ECA. A Ang II é então clivada pela ECA2 e se transforma em Ang-(1-7). Uma outra via é a hidrólise da Ang I pela ECA2, que é transformada em Ang-(1-9), que, por sua vez, é clivada pela ECA e transformada em Ang-(1-7). A ECA também degrada a Ang-(1-7) em Ang-(1-5) (FERRARIO et al., 1997).

Evidências da existência de um receptor específico para Ang-(1-7) foram levantadas principalmente após a síntese de um antagonista específico para ele, o A-779 ou D-Ala₇-Ang-(1-7; SANTOS et al., 1994). Foi inicialmente demonstrado, em rins de camundongos, um receptor funcional para Ang-(1-7), o receptor MAS (SANTOS et al., 2003). Este receptor foi também encontrado em ovário de ratas durante todo o ciclo estral (REIS et al., 2009).

A presença do receptor MAS foi também demonstrada no ovário de mulheres, mais especificamente nos folículos ovarianos de várias categorias (primordiais, primários, secundários e antrais) assim como no estroma ovariano e no corpo lúteo (REIS et al., 2011).

Desta forma, COSTA et al., (2003) demonstraram a presença da Angiotensina (1-7) no ovário de ratas em níveis maiores no pró-estro e estro, fato este que pode contribuir na maturação dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs). Em coelhas, VIANA et al. (2011) detectaram a presença de angiotensina (1-7) e seu receptor MAS.

Assim a adição de angiotensina-(1-7) em CCOs pode ativar a proteína PI3K/Akt levando a um aumento de estradiol via aromatase. Segundo MINGOTI (1999) quanto maior a concentração de estradiol maior também a porcentagem de oócitos que atingem a fase de MII.

Desta forma estas células podem ter seu potencial aumentado pela adição de Ang-(1-7) ao meio de maturação aumentando a produção de estradiol via ativação da proteína PI3K/Akt e produção de estradiol pelo *cumulus*.

A Ang (1-7) é o ligante para o receptor MAS (SANTOS et al., 2003) e suas ações são especificamente inibidas quando o receptor MAS é bloqueado com dAla7-Ang-(1-7), também conhecido como A-779 (DILAURO & BURNS, 2009). A expressão de RNAm para MAS foi verificada em vários tecidos, incluindo ovários de roedores e bovinos (COSTA et al., 2003; SANTOS et al., 2011) e testículos de ratos e homens (METZGER et al., 1995; REIS et al., 2010). No entanto, pouco se sabe sobre a possível função ou via de ação da Ang (1-7) na ovulação.

A inibição da produção de Ang II por inibidor de ECA não altera a esteroidogênese ou a ovulação. Tais efeitos poderiam ser devidos à Ang (1-7), um peptídeo do SRA cuja formação pode ocorrer independente da ECA.

A enzima conversora de angiotensina pode participar no metabolismo da Ang-(1-7), visto que sua inibição pode reduzir a degradação da Ang-(1-7), inibindo sua conversão em Ang-(1-5) e aumentando sua biodisponibilidade (CHAPPELL et al., 1998).

3.6 Hoechst 33342

A utilização de técnicas para avaliação da qualidade dos oócitos após o período de MIV permite a verificação das alterações que ocorrem *in vitro*, sendo necessária estas análises para melhoria das biotécnicas reprodutivas.

A técnica mais empregada é a análise subjetiva da morfologia da expansão das células do *cumulus* a partir da utilização de um estereomicroscópio (SILVA, 2015), que antecede a etapa de fertilização *in vitro*. Outras técnicas são amplamente utilizadas nos laboratórios de PIV

para mensurar as taxas de maturação, porém estas estruturas tornam-se inviáveis para o desenvolvimento artificial posterior.

Análises utilizadas para verificação da eficiência da PIV são a quantificação das espécies reativas de oxigênio (ERO), TUNEL, níveis intracelulares de glutatona (GSH) (YOON et al., 2014) e microscopia de fluorescência (DUARTE et al., 2010).

Esta última que proporciona taxas de configuração da cromatina de oócitos, indicando, por sua vez, o estágio meiótico alcançado após terem sido maturados *in vitro* (DUARTE et al., 2010). Para tanto, utiliza-se o corante Hoechst-33342 que adentra as células, se intercalando entre as bases nitrogenadas do DNA, possibilitando visualizar o grau de organização da cromatina nuclear com filtros específicos.

A coloração com Hoechst 33342 é bastante utilizado para avaliação da MIV de oócitos e para a contagem do número de células embrionárias (GUEMRA et al., 2013)

Dentro de um programa de PIV, a análise supracitada é de suma importância, uma vez que, para esta biotécnica, estimar a qualidade e viabilidade oocitária é o ponto chave para se obter excelentes taxas de maturação e consequente fecundação *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética e Experimentação Animal

Os procedimentos e métodos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 016/2018 para a execução da pesquisa, atendendo as normas de Bem-Estar Animal da Resolução do CRMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008.

4.2 Obtenção dos ovários *post-mortem*

Foram coletados no abatedouro Municipal D.A. Vital, localizado na BR – 135, no km 11, em São Luís – MA, ovários de fêmeas bovinas, sem histórico clínico-reprodutivo, idade e fase aleatória do ciclo estral logo após o abate e evisceração.

O material *post-mortem* foi depositado no recipiente térmico contendo solução salina – fosfato tampão (DMPBS – FLUSH, NUTRICELL, BR) preparado previamente e suplementado com 1mL de gentamicina (GENTRIN®, OURO FINO Ltda., BR) sob temperatura de 37°C e transportado ao Laboratório de Reprodução Animal – LABRA, da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA no período máximo de 2 (duas horas).

Os tecidos e ligamentos aderidos aos ovários foram retirados com auxílio de uma tesoura ponta-romba e pinça anatômica. Em seguida o material foi depositado no Becker com DMPBS – FLUSH (NUTRICELL, BR) aquecido em banho-maria a 37°C. Posteriormente, os ovários foram pesados, em gramas, para determinar o peso inicial (Pi) e peso final (Pf), antes e após a aspiração, respectivamente.

4.3 Punção folicular ovariana

Os complexos *cumulus*-óócitos (CCOs) foram recuperados por aspiração dos folículos ovarianos mensurados entre 2 a 8mm utilizando agulhas descartáveis 25 x 0,7mm (22G), acoplado a uma seringa de 3 ou 5mL. O líquido folicular obtido da punção folicular foi depositado em um tubo Falcon de 15 ou 50 mL, de acordo com a quantidade de ovários *post-mortem* obtidos por coleta, em banho-maria a 37°C.

Após a aspiração, o líquido folicular passou pelo processo de decantação durante 15 minutos para obtenção do *pellet*. O conteúdo decantado foi depositado, com auxílio de pipeta de Pasteur, e transferido para placa de Petri (CORNING, 430167) de 100 x 20mm para pesquisa e seleção diluído em DMPBS – FLUSH (NUTRICELL®, BR) aquecido sob uma lupa estereomicroscópio (NOVA Optical Systems).

Os CCOs foram classificados de acordo com a qualidade morfológica conforme LEIBFRIED e FIRST, 1979:

Grau I: *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom;

Grau II: *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando-o por completo, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas de modo heterogêneo, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia, ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura, ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida;

Grau III: *cumulus* presente, mas expandido, ooplasma contraído, degenerado, vacuolado, ou fragmentado, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino e

Grau IV: oócito desnudo sem *cumulus*.

Entretanto, somente os CCOs de grau I e II foram selecionados como viáveis e transferidos para uma placa de Petri 30x10mm (CORNING, 430167) contendo 100µL de meio manutenção Holding Plus 0,4% BSA (VITROCELL, BR).

4.4. Grupos Experimentais

Os CCOs foram distribuídos entre quatro tratamentos: Controle (**C**), 10^{-1} (**T1**), 10^{-3} (**T2**), 10^{-5} µM (**T3**) de angiotensina (1-7) (ANGIOTENSIN FRAGMENT 1-7 ACETATE SALT HYDRATE, SIGMA – ALDRICH, USA, 5mg, Ref. A9202).

A placa com meio de maturação (MIV, VITROGEN, BR) com os grupos experimentais: Controle e suplementados com diferentes concentrações de angiotensina (1-7) foi preparada *over-night* ao momento de chegada dos materiais *post-mortem* no laboratório e estabilizadas em incubadora sob atmosfera gasosa, temperatura e umidade controlada.

4.5. Maturação *in vitro* (MIV)

Após o rastreio e classificação, os CCOs passaram por lavagens em quatro microgotas de 50 µL (gota/grupo) contendo meio lavagem (VITROGEN, BR) em placa de Petri de 100 x 20 mm. Após a individualização dos grupos e lavagens, os CCOs foram transferidos para as microgotas dos grupos experimentais (100µL/grupo/±20CCOs) na placa com meio de maturação preparada com antecedência e recobertas por óleo mineral (SIGMA – ALDRICH, USA, Ref. M8410).

Posteriormente, as placas foram armazenadas na incubadora (SANYO, PANASONIC, USA), sob temperatura de 38,5°C, em atmosfera gasosa de 5% de CO₂ por 24h, iniciando, então, o processo de maturação *in vitro*.

4.5.1 Avaliação da maturação *in vitro* (MIV)

Após 24 horas do processo de MIV, os CCOS maturados foram avaliados quanto o grau de expansão das células do *cumulus* utilizando uma lupa estereomicroscópio (NOVA Optical Systems). Posteriormente, cada grupo experimental foi depositado num eppendorf de 1,5mL contendo 100µL de DMPBS – FLUSH e 100µL de hialuronidase (Hyaluronidase from bovine testes, SIGMA – ALDRICH, USA, 100mg, Ref. H3506), cada eppendorf sofreu agitação no vórtex durante 5 minutos para remoção das células do *cumulus*.

As estruturas desnudas foram recuperadas sob lupa estereomicroscópio e depositadas na placa de banho (4 gotas/50µL/grupo) com meio de lavagem para remoção dos restos celulares e excesso de hialuronidase para avaliação com o Hoechst-33342.

4.5.2 Coloração com Hoechst-33342

A análise do estádio de maturação oocitária nuclear ocorreu através da técnica de fluorescência Hoechst-33342 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride, SIGMA – ALDRICH, USA, 25mg, Ref. B2261) de forma a avaliar a progressão da maturação nuclear até Metáfase II (MII).

Os oócitos foram transferidos da gota com meio de lavagem para uma lâmina de microscopia na qual continha uma gota de 50µL (10µg/mL) de Hoechst-33342 onde permaneceram por cinco minutos antes da avaliação dos estádios de maturação nuclear.

Para a avaliação foi utilizado um microscópio de fluorescência com um comprimento de onda de excitação de 365 nm e um comprimento de onda de emissão de 420 nm e os achados nucleares fluorescente em azul após a MIV foram classificados em: vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), Metáfase (MII) e Não Identificado (NI).

A presença da VG indica que o oótipo está na fase diplóteno da prófase I, apresentando um núcleo vesicular imaturo com cromossomos pouco condensados. Em contraste, RVG ocorre quando os cromossomos apresentam grau de distribuição disperso e núcleo ainda com aspecto vesicular e, por fim, a placa metafásica caracteriza o estágio final da maturação oocitária, localizada na periferia do núcleo do oótipo, indicando a MII (HEWITT & ENGLAND, 1998). Oótipos em metáfase II foram considerados maduros.

4.6. Produção *in vitro* de embriões

Na segunda parte do experimento, foram submetidos 435 CCOS viáveis oriundos de 175 ovários (98 com CL e 77 sem CL) com peso inicial e final de 1468g e 1194g, respectivamente, aos procedimentos *in vitro* nos grupos experimentais citados anteriormente. Estas estruturas foram submetidas à MIV e após esta etapa foram submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) para obtenção de unidades embrionárias.

4.6.1 Fertilização *in vitro* (FIV)

Utilizou-se meio FIV (VITROGEN, BR) para confecção das quatro gotas de 100 µL em placas de Petri de 60 x 15 mm, 24 horas antes da fertilização *in vitro* propriamente dita para estabilização na incubadora.

Foi utilizado meio de capacitação e meio Sperm previamente adquiridos (VITROGEN, BR) para formação do gradiente de separação espermática. Em um eppendorf de 1,5mL depositou-se 200µL do meio Sperm adicionando posteriormente 200µL de percoll. Em seguida foi adicionado de baixo para cima 400µL de Percoll para formação do gradiente de 90% e aquecido meia hora antes do término da MIV.

Utilizou-se sêmen criopreservado descongelado em banho-maria a 36,5°C em um tempo de 30 segundos para palheta de 0,5mL

Após descongelamento do sêmen, todo volume da palheta foi depositado no gradiente de Percoll e submetido a centrifugação por 6 minutos à uma força centrípeta de 600G e rotação de 3000 rotações por minuto (rpm). Em seguida retirou-se o pellet formado e o transferiu para 400µL de meio FIV aquecido, onde foi centrifugado novamente por 3 minutos à uma força centrípeta de 150G e rotação de 1300rpm.

Ao fim da centrifugação foi retirado o sobrenadante. Do pellet formado retirou-se 5µL e o depositou em um eppendorf com 250µL de meio FIV. Para análise de motilidade e vigor pós centrifugação foi retirado 30µL.

Para determinação da concentração espermática depositou-se 5µL do pellet em um eppendorf contendo 250µL de formol salina, sendo realizada com auxílio de Neubauer. Posteriormente os dados obtidos foram aplicados na seguinte fórmula:

- **Concentração espermática** = pellet x (motilidade/1000) x espermatozoides – pellet

O valor obtido corresponde a quantidade de meio FIV que foi ressuspensido junto ao pellet para concentração final de 1×10^6 espermatozoides por mL, equivalendo a 7 μL de dose inseminante. Essa dose inseminante foi padrão para todas as gotas.

A FIV ocorreu ao término da maturação com a coincubação dos CCOs e os espermatozoides na placa de FIV, nas respectivas gotas de tratamento em estufa com 5% de CO₂ a temperatura de 38,5°, durante 22 horas.

4.6.2 Cultivo *in vitro* (CIV)

A placa de cultivo foi preparada *over-night* logo após a FIV, contendo 4 gotas de 100 μL de meio CIV (VITROGEN, BR) em placas de Petri 60x15 mm recobertas por óleo mineral, juntamente com 800 μL de meio CIV em um eppendorf para lavagem das estruturas.

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram lavados por quatro vezes em gotas de 50 $\mu\text{L}/\text{grupo}$ com meio CIV para retirada das células do *cumulus* remanescentes e depositados na placa previamente preparada.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D3, D7 e D9 para avaliação da clivagem, taxa de blastocisto e eclosão dos mesmos, respectivamente. Durante o protocolo de cultivo realizou-se o *feeding* que consiste na retirada de 80% (80 μL) do volume de cada gota de cultivo e reposição de mesmo volume nas gotas no D3 e D5, sendo preparadas no D2 e D4, respectivamente.

4.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos ($0, 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$ μM de angiotensina 1-7) em 8 repetições com CCOS viáveis para análise da maturação *in vitro* e 6 repetições com CCOS viáveis para produção *in vitro* de embriões.

As variáveis estudadas (taxa de maturação, estágio da meiose, taxa de clivagem, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e eclosão) foram submetidos ao teste exato de Fischer ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa do experimento, os oócitos foram recuperados de 179 (cento e setenta e nove) ovários, dos quais 88 (oitenta e oito) apresentavam corpo lúteo (CL) e 91 (noventa e um) não possuíam essa glândula endócrina. Anteriormente às aspirações foliculares ovarianas, foi obtido o peso inicial e, posteriormente, o peso final dos ovários, 1.514g e 1276g, respectivamente.

Para avaliar maturação nuclear durante a MIV, foram utilizados um total de 639 oócitos viáveis distribuídos em quatro tratamentos (C, T1, T2 e T3). A tabela 1 demonstra a qualidade dos oócitos utilizados na maturação *in vitro* por tratamento.

Tabela 1. Qualidade morfológica dos complexos *cumulus*-oócito (CCOS) de fêmeas bovinas utilizadas no processo de maturação *in vitro*.

Tratamentos	GI	GII
C	97	63
T1	93	66
T2	94	73
T3	89	64
TOTAL	373	266

A morfologia do núcleo dos oócitos e a disposição das células do *cumulus* é crucial para o sucesso da produção *in vitro*, como afirma BLOGIOLO et al., (2007) que oócitos de fêmeas doméstica desnudos, ou seja, sem a presença do *cumulus* proporcionam menores taxas de maturação nuclear e, consequentemente, menor quantidade de unidades embrionárias.

As células dos *cumulus* mantém íntima relação com o oócito por meio das junções GAP comunicantes, é fundamental para aquisição de competência oocitária para suportar os posteriores eventos da fertilização e do desenvolvimento embrionário (SHIMADA e TERADA, 2002).

Ovários *post-mortem* constituem numa fonte abundante e viável para execução de pesquisas relacionadas às biotécnicas reprodutivas, no entanto não podem ser utilizadas em programas de melhoramento genético, pois são oriundos de animais de descarte com histórico sanitário, nutricional e reprodutivo desconhecidos (CROCOMO et al., 2012)

Com o auxílio da técnica de fluorescência Hoescht-33342 verificaram-se os estágios de maturação nuclear nos quatro tratamentos. Foi demonstrado a presença de oócitos em estágio de VG, RVG e MII, conforme Tabela 2.

Em relação às estruturas em vesícula germinativa (VG), os grupos Controle, T1 e T3 foram semelhantes entre si ($P<0,05$) e o grupo tratado com $10^{-3}\mu\text{M}$ de angiotensina (1-7) no meio de maturação obteve a menor taxa entre os grupos em estudo.

No estágio nuclear caracterizado como rompimento da vesícula germinativa (RVG), o grupo T2 não diferiu dos demais grupos ($P<0,05$), porém o grupo T3 foi superior ao grupo controle.

Na obtenção de estruturas que chegaram até o estágio de metáfase II, o grupo T2 não diferiu estatisticamente dos grupos T1 e T3, porém foi superior ao grupo controle ($P<0,05$). Os grupos Controle, T1 e T3 não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 2. Avaliação da maturação nuclear através da técnica de fluorescência HOESCHT - 33342 de fêmeas bovinas utilizadas no processo de maturação *in vitro* tratados ou não com Angiotensina (1-7).

Tratamentos	VG	RVG	MII
C	5,0% (8/160) ^a	0,6% (1/160) ^{ab}	35,0% (56/160) ^b
T1	5,0% (8/159) ^a	1,2% (2/159) ^a	40,3% (64/159) ^{ab}
T2	0,6% (1/167) ^b	3,6% (6/167) ^a	48,0% (81/167) ^a
T3	3,9% (6/153) ^a	3,9% (6/153) ^a	41,0% (63/153) ^{ab}

a,b: letras diferentes entre colunas indicam diferença estatística ao teste exato de Fischer ($P<0,05$) nos tratamentos
Legenda: VG: Vesícula germinativa; RVG: Rompimento da vesícula germinativa; MII: Metáfase II.

A taxa de maturação nuclear obtidas nos grupos experimentais foram inferiores à porcentagem exibida por outros trabalhos envolvendo a maturação *in vitro* (GUEMRA et al., 2013; KERE et al., 2013; SOVERNIGO et al., 2017).

Segundo APPARÍCIO-FERREIRA et al., (2010), nos bovídeos, a taxa de maturação aproxima-se de 90%, o que não foi identificado no presente estudo, sugerindo a existência de causas intrínsecas dos oócitos utilizados nesse experimento.

Confirmando a função do LH *in vivo* na quebra da vesícula germinativa em oócitos de ratas *in vitro*, HONORATO-SAMPAIO (2012) obteve taxa de 83% de RVG sendo superior ao grupo controle (4%) na pós-maturação *in vitro*.

COSTA (2017) ao avaliar o efeito da angiotensina (1-7) na maturação oocitária *in vitro* de fêmeas ovinas nos grupos Controle, Angiotensina (1-7) a concentração de 1 μ M e Angiotensina (1-7) a 1 μ M associado com seu antagonista, A-779, na mesma concentração, diminuiu a taxa de maturação os grupos tratados com Ang (1-7), 16,6%, e acrescido do seu antagonista (14,30%). Entretanto, o grupo controle obteve taxa melhor (45,50%) em relação aos demais grupos, mas apresentando valor abaixo de maturação *in vitro* encontrado na espécie bovina.

Quanto maior a concentração de estradiol em oócitos, maior a porcentagem das estruturas atingirem a metáfase II, de acordo com MINGOTI (1999). Tal fato justifica a adição de angiotensina nos grupos experimentais do presente estudo, visto que a adição deste peptídeo poderia aumentar a produção de estradiol, via ativação da proteína PI3K/Akt e sua produção pelas células do *cumulus*.

HONORATO-SAMPAIO (2012) ao utilizar três concentrações diferentes de angiotensina (1-7) *in vitro* (10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M) para a retomada da atividade meiótica e obteve mais de 30% de RVG no grupo 10^{-8} M, fornecendo evidências de que Ang- (1-7) participa da retomada meiótica induzida por gonadotrofina.

COSTA (2017) ao avaliar diferentes concentrações de angiotensina (1-7) na MIV de oócitos de ovinos, sendo os grupos: controle, Ang (1-7) a 0,5 μ M e Ang (1-7) a 0,25 μ M não obtendo diferença significativa entre os grupos citados.

O que corrobora com os dados obtidos na suplementação da MIV com Ang (1-7) em oócitos bovinos que avaliou três diferentes concentrações não obtendo diferença significativa, sugerindo mais estudos com suplementação diversa nos grupos experimentais e a adição de outras substâncias que possam elucidar o papel deste heptapeptídeo na MIV.

COSTA et al., (2003) relatam que a Ang (1-7) está presente em ovário de rata e que sua concentração varia durante o ciclo estral, sendo as concentrações mais altas observadas no proestro e estro e que a Ang (1-7) adicionada ao meio de perfusão de ovários de rata *in vitro* na concentração de 1 μ M aumentou a produção de E₂ e P4.

A assincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática e, possivelmente, danos ao fuso meiótico oocitário limitam a aplicação da MIV. FERREIRA (2008), sugeriu que uma pré-maturação *in vitro* com bloqueadores da meiose melhorasse a qualidade oocitária, favorecendo a embriogênese inicial, visando manter os ovócitos em estádio de vesícula germinativa (VG)

para que os mesmos tenham um tempo adicional para sofrerem as modificações que ocorrem antes da maturação propriamente dita (HYTTEL et al., 1997).

In vivo, o reinício da meiose ocorre após do pico pré-ovulatório de LH, quando é realizada a punção folicular ovariana, após a retirada do CCO do ambiente folicular ocorre o reestabelecimento da divisão celular. Dessa forma, o uso de inibidores da maturação nuclear, como a butirolactona (BLI) tem ação sobre o fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos bovinos foram submetidos à maturação *in vitro* obtendo resultados similares nos grupos tratados ou não com BLI no período de 18 horas (ADONA, 2006).

Em suínos, a maturação nuclear e citoplasmática foi estimulada pela adição de 100ng/mL de Ang II ao meio de maturação *in vitro*, demonstrando que a Ang II é capaz de reverte o efeito inibitório causado pelas células foliculares sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos (LI et al., 2004; GIOMETTI et al., 2005).

DONOGHUE et al. (2000) relataram e nomearam uma enzima formadora de Ang (1-7) análoga à ECA, a ECA2, capaz de gerar Ang (1-7) diretamente a partir da Ang II ou indiretamente da Ang I. Com relação às funções da Ang (1-7), de acordo com SANTOS et al., 2008, este heptapeptídeo pode executar funções similares, opostas ou distintas da Ang II, visto que a ECA2. [CADE O RESTO?]

No presente experimento não foi verificado a ação do antagonista específico do receptor MAS, o A-779 que bloqueia as ações induzidas pela Angiotensina (1-7; DILAURO & BURNS, 2009). COSTA (2017) não obteve uma taxa de maturação *in vitro* satisfatória utilizando a Ang (1-7) associada ao A-779 na concentração de 1 μ M.

As concentrações (10^{-1} , 10^{-3} e $10^{-5}\mu$ M) estudadas foram menores diferindo de COSTA (2017) e a associação com seu antagonista, via receptor MAS, proporcionaria maiores elucidações da ação da Ang (1-7) *in vitro*. A expressão de MAS e ECA2 foram relatadas recentemente em ovários de diferentes espécies (PEREIRA et al., 2009; REIS et al., 2011; VIANA et al., 2011)

HONORATO-SAMPAIO (2012) utilizou o A-779 na ausência e presença de angiotensina (1-7) e obteve bloqueio da maturação do oóbito induzida por Ang (1-7), semelhante aos oócitos incubados sem LH.

Para avaliar o efeito da angiotensina II na MIV, via receptor AT2, seu antagonista específico, PD123319, reduziu o número de oócitos com RVG após estimulação com Ang II (YOSHIMURA et al. 1996).

No entanto, no presente estudo, o efeito de Ang (1–7) na retomada meiótica foi semelhante ao efeito de Ang II observado em outras espécies (SANTOS et al., 2008). O mecanismo do efeito Ang- (1–7) sobre os a retomada da meiose é atualmente desconhecida.

São considerados maduros os oócitos que atingem a metáfase II para reinício da meiose após a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, no presente experimento houveram razoáveis proporções de VG e RVG, corroborando com os achados de SOUZA (2009).

O tempo necessário de incubação requer de 18 a 24 horas de maturação na espécie bovina, oócitos que não chegam até metáfase II neste período não possuem habilidade de proporcionar embriões.

No presente experimento, a taxa de oócitos maturados com angiotensina (1-7) foi similar ao grupo controle. Autores explicam que o reinício da meiose durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, a habilidade de produzir proteínas não é afetada, porém, ele perde a capacidade de transcrever (SIRARD & COENEN, 1994).

A transcrição e o armazenamento dessas moléculas ocorrem durante a foliculogênese, no período em que o núcleo oocitário permanece em estado quiescente (LANDIM-ALVARENGA et al., 2014).

A presença da angiotensina 1-7 na maturação oocitária foi vista por CARVALHO et al., (2017), onde este avaliou líquido folicular de mulheres e constatou que quanto mais alta a proporção de maturação oocitária, mais altos os níveis séricos deste peptídeo.

SANTOS et al., (2011) demonstrou que vacas tratadas com sintético do GnRH por via intramuscular, apresentaram aumento da concentração de angiotensina 1-7 no líquido folicular de folículos pré-ovulatórios, correlacionando-a mais uma vez positivamente com a maturação oocitária. Entretanto, ainda é pouco conhecida de que forma esta participa dos processos reprodutivos.

A taxa de maturação refere-se à quantidade de células germinativas que apresentaram uma completa maturação oocitária, caracterizada pela presença da placa metafásica (Figura 3).

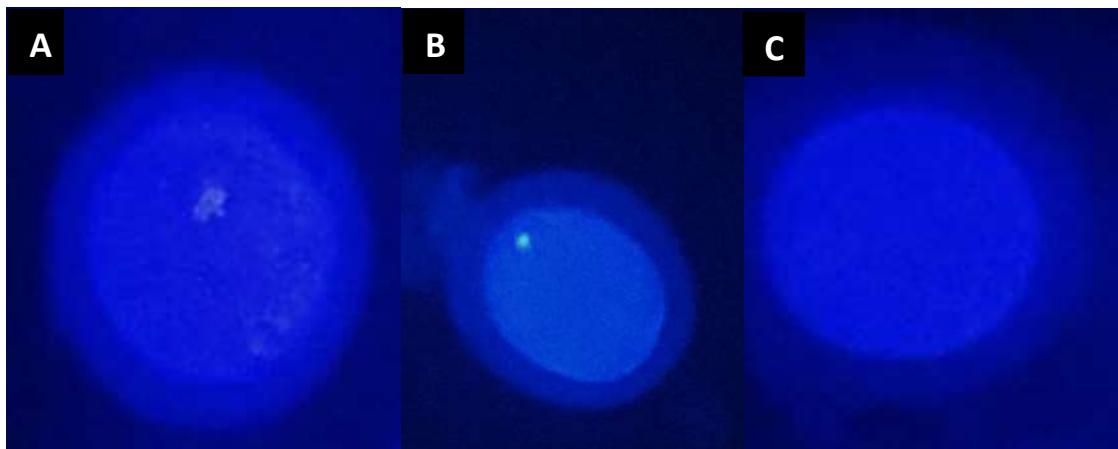


Figura 3. Coloração dos oócitos bovinos com Hoescht-33342 para avaliação da maturação nuclear. A: Oóцит apresentando rompimento da vesícula germinativa, B: Oóцит em estágio de Metáfase II, C: Não Identificado/Oóцит degenerado. Objetiva 20X.

Nesse sentido, é possível alguns oócitos empregados na maturação *in vitro* apresentem alterações deletérias não aparentes, apesar da exibição de uma morfologia ideal pós-MIV, o que pode interferir na aquisição da maturação nuclear.

Técnicas celulares e moleculares, como o Imunohistoquímica, TUNEL e PCR em tempo real podem oferecer aprimoramento da técnica de produção *in vitro* de embriões bovinos e as funções que a Ang (1-7) executa na PIV.

A avaliação da taxa de clivagem feita no D3, a considerar o dia da fertilização *in vitro* como sendo D0, discriminada na Tabela 3 também não apresentou diferença estatística ($P<0,05$) entre os grupos experimentais.

Tabela 3. Taxa de clivagem dos embriões avaliados em D3 em relação ao total de CCOs que passaram pelo processo de cultivo *in vitro* nos grupos experimentais.

Grupo experimental	n	Clivagem (%)
Controle	105	49,5% (52/105) ^a
T1	114	50% (57/114) ^a
T2	105	40% (42/105) ^a
T3	111	41,4% (46/111) ^a

^{a,b} Números seguidos de letras minúsculas desiguais na linha diferem estatisticamente ao teste exato de Fischer ($P<0,05$) nos tratamentos

No total de embriões gerados, não houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Taxa de embriões *in vitro* bovinos com suplementação ou não do meio de maturação com diferentes doses de angiotensina (1-7).

Grupo experimental	n	Total de embriões (%)
Controle	105	8,6% (9/105) ^a
T1	114	14,9% (17/114) ^a
T2	105	8,6% (9/105) ^a
T3	111	7,2% (8/111) ^a

^{a,b} Números seguidos de letras minúsculas desiguais na linha diferem estatisticamente ao teste exato de Fischer ($P<0,05$) nos tratamentos

Em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário avaliado no sétimo dia (D7; Figura 4) após o processo de FIV, o tratamento suplementado com $10^{-1}\mu\text{M}$ de angiotensina 1-7 (T1) apresentou maior taxa de blastocisto inicial em relação ao tratamento controle e suplementado com $10^{-3}\mu\text{M}$.

Não houve diferença estatística ($P<0,05$) na obtenção de blastocistos nos grupos experimentais. Na taxa de blastocistos expandidos, não houve diferença estatística ($P<0,05$) quanto ao tratamento suplementado com $10^{-1}\mu\text{M}$ e $10^{-3}\mu\text{M}$. Os tratamentos Controle e T3 não apresentaram blastocisto expandido.

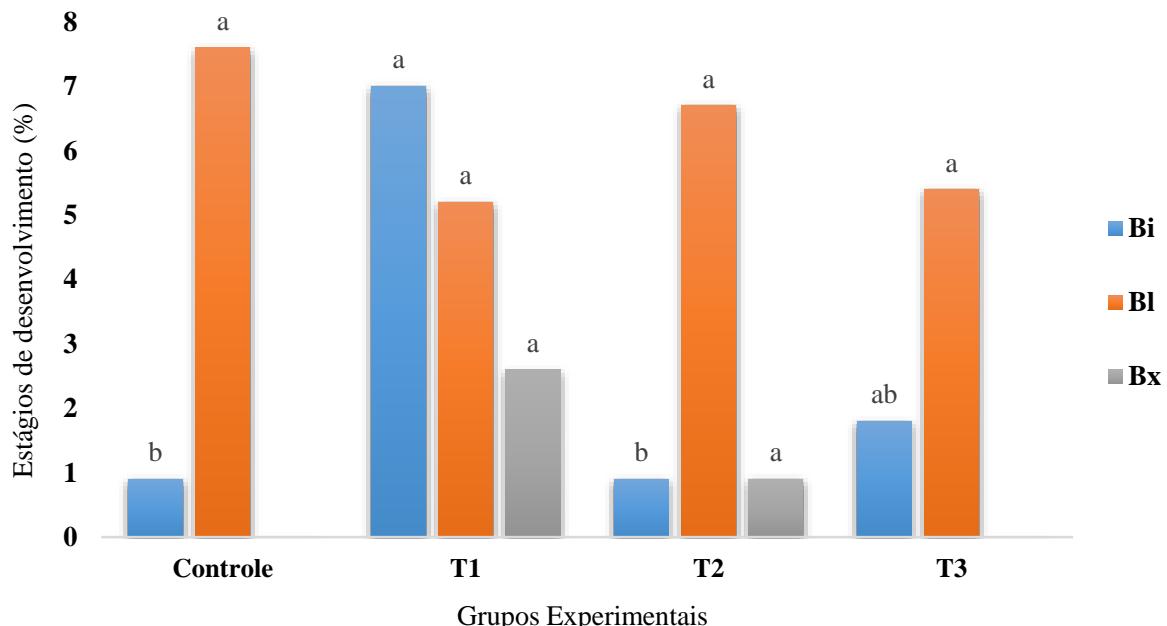


Figura 4. Taxa de estágios de desenvolvimento embrionário bovino produzido *in vitro* com meio de maturação suplementado ou não com diferentes concentrações de angiotensina 1-7.

A taxa de qualidade embrionária também foi descrita em graus I, II e III, conforme manual da IETS, os blastocistos iniciais, blastocistos e blastocistos expandidos (Figura 5).

Na qualidade denominada grau I o tratamento de menor dose T3 ($10^{-5}\mu\text{M}$) apresentou menor taxa e diferiu estatisticamente ($P<0,05$) do tratamento de maior dose T1 ($10^{-1}\mu\text{M}$) que não apresentou diferenças entre os grupos Controle e T2, o que indica a influência da angiotensina 1-7 na qualidade embrionária. Para os graus II e III, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

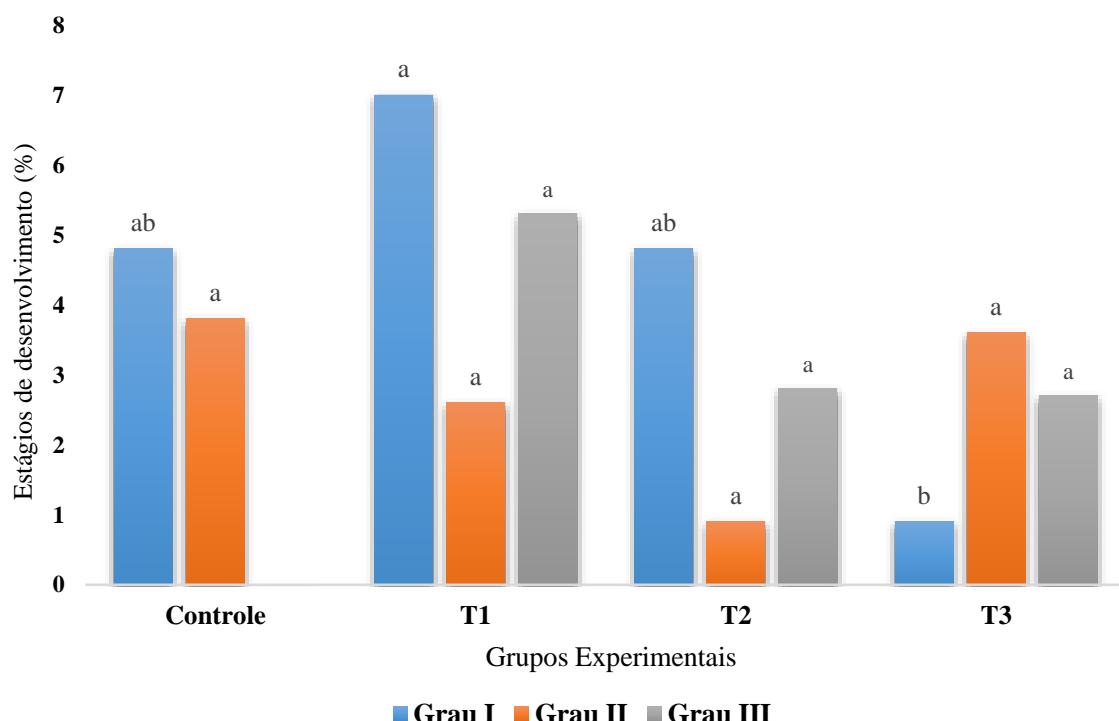


Figura 5. Taxas de qualidade embrionária avaliados em graus de embriões bovinos com meio de maturação suplementado ou não com diferentes concentrações de angiotensina 1-7.

Não houveram embriões eclodidos no grupo T3, e a taxa de eclosão embrionária não diferiu estatisticamente ($P<0,05$) aos demais grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de eclosão dos embriões bovinos produzidos *in vitro* avaliados em D9 em relação ao total de blastocistos gerados a partir de diferentes concentrações de angiotensina (1-7).

Grupo experimental	Total de Blastocistos	Embriões Eclodidos (%)
Controle	9	11,1% (1/9) ^a
T1	17	23,5% (4/17) ^a
T2	9	11,1% (1/9) ^a
T3	8	-

^{a,b} Números seguidos de letras minúsculas desiguais na linha diferem estatisticamente ao teste exato de Fischer ($P<0,05$) nos tratamentos.

A taxa de estruturas degeneradas e não fertilizadas de cada tratamento está ilustrada na figura 6, que também não apresentou significância estatística ($P<0,05$).

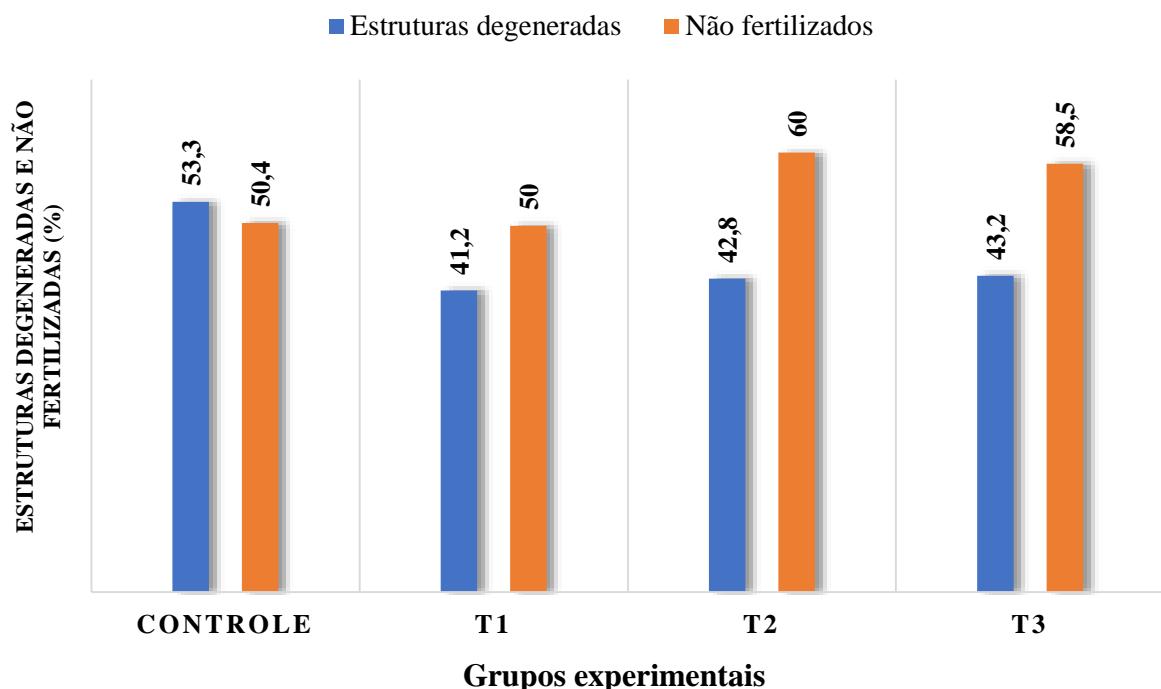


Figura 6. Taxas de estruturas degeneradas e não fertilizadas na produção *in vitro* de embriões bovinos com meio de maturação suplementado ou não com diferentes doses da angiotensina 1-7.

A apoptose é caracterizada num ordenado e programado de morte celular descrito pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA e fagocitose, fragmentação citoplasmática e nuclear (MAKAREVICH & MARKKULA, 2002).

Contudo, quando o número ou razão de células apoptóticas por células normais aumenta, esse evento torna-se prejudicial ao desenvolvimento, interferindo em sua qualidade embrionária (LEVY, 2001).

A incidência de apoptose é maior em embriões produzidos *in vitro* do que *in vivo* (KNINJ et al., 2003), provavelmente induzida pelo estresse provocado pelo cultivo *in vitro*, envolvendo atraso no desenvolvimento embrionário acompanhado de fragmentação celular (JURISICOVA & ACTON, 2004).

Com base nesses conhecimentos, especialmente no fato do inibidor de ECA aumentar a biodisponibilidade de Ang-(1-7), demonstrou-se que a adição do Enalapril, inibidor de ECA, ao protocolo convencional de superovulação em pequenos ruminantes, à base de P4, FSH e PGF2 α , aumentou a produção de estrógeno associado a um maior número de embriões transferíveis, melhorou a qualidade de embriões (COSTA, 2017).

6. CONCLUSÃO

A adição do peptídeo angiotensina (1-7) no meio de maturação *in vitro* não proporcionou taxas superiores de metáfase II em relação ao grupo Controle. No desenvolvimento embrionário, a angiotensina (1-7) não melhorou a clivagem nem a quantidade de embriões totais, o grupo $10^{-1}\mu\text{M}$ proporcionou quantitativo superior de blastocistos iniciais. No entanto, mais análises são necessárias para elucidar as ações realizadas pela angiotensina (1-7) na produção *in vitro* de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.127-140, 2004.
- ADONA, P. R. **Bloqueio da meiose com butirolactona I em ovócitos bovinos: efeitos sobre a maturação nuclear e citoplasmática**. 76f. 2006. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2006.
- ADONA, P. R.; LEAL, C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butirolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3 p. 354-359, 2006.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.171–179, 2010.
- ALDERMAN, M.H. Renin Angiotensin System and the Heart. **Circulation**, n.110, p.496-497, 2004.
- ALLEN, A.M.; MOELLER, I.; JENKINS, T.A.; ZHUO, J.; ALDRED, G.P.; CHAI, S.Y.; MENDELSON, F. A. O. Angiotensin receptors in the nervous system. **Brain Research Bulletin**, v.47, n. 1, p. 17–28, 1998.
- ANDRADE, E.R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-85, 2010.
- ANEL, L.; SEVILLANO, C.; ALVAREZ, M.; ALEGRE, B.; ANEL, E.; DOMÍNGUEZ, C.; ANGUITA, B.; JIMENEZ MACEDO, A .R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, p.526 536, 2007.
- APPARÍCIO-FERREIRA, M. **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados in vitro em meios sequenciais com hormônios e espermatozoides**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010.
- ARAÚJO, M.S. et al. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação *in vitro*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v.10, n.18, 2014.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L. U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F.; FERRAZ, M.L.; BARNABE, R.C. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.285-292, 2007.
- BERNADI, M.L. Produção *in vitro* de Embriões Ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p1-16, 2005.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 56, n.3. p.184-194, 2009.

BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; ROSATI, I.; ZEDDA, M. T.; LEONI. G.; SUCCU, S.; PAU, S.; LEDDA, S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. **Theriogenology**, v.68, p.1138-1149, 2007.

BRENTJENS, J. R.; MATSUO, S.; ANDRES, G. A.; CALDWELL, P.R.; ZAMBONI, L. Gametes contain angiotensin converting enzyme (kininase II). **Experimentia**, v.42, p.399-402, 1986.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.5-13, 2006.

BURREL, L.M.; JOHNSTON, C.I.; TIKELLIS, C.; COOPER, M.E. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **Trends Endocrinology Metabolism**, v.15, n.4, p.166-169, 2004.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15–25, 2013

CARRASCO-POZO, Catalina et al. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: Role of NF-κB and Nrf2. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 27, p. 289–298, 2016.

CARVALHO et al. Angiotensin-(1–7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation. **Human Reproduction**, pp. 1–7, 2017.

CAVALLO, I. K. et al. Angiotensin-(1–7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation. **Human Reproduction**, Vol.32, No.6 pp. 1318–1324, 2017.

CETICA, P.D. et al. Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte *In vitro* Maturation. **IUBMB Life**, v.51, p.57–64, 2001.

CHAVES, R.N. et al. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.37-49, 2010.

CHAPPELL, M.C.; PIRRO, N. T.; SYKES, A.; FERRARIO, C. M. Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme. **J Am Heart Assoc**, v.31, p.362-367, 1998.

CHILD, T. J.; ABDUL-JALIL, A. K.; GULEKI, B.; TAN, S. L. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries and women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**, v.76, p.936-942, 2001.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State of the production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.437-445, 2004.

CÓRDOVA, B., MORATÓ, R., FRUTOS, C., BERMEJO-ÁLVAREZ, P., PARAMIO, T., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., MOGAS, T. Effect of leptin during *in vitro* maturation of

prepubertal calf oocytes: Embryonic development and relative mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. **Theriogenology**, v. 76, p. 1706–1715, 2011.

COSTA, A. P.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; PEREIRA, V. M.; SILVA, L. F.; VIEIRA, M. A.; SANTOS, R. A.; DOS REIS, A. M. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003.

COSTA, A.S. **Angiotensina-(1-7): Efeito na maturação *in vitro* de oócitos ovinos**. 2017. 50f. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Piauí-UFPI, Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, 2017.

COSTA, A. P. R. **Angiotensinas em ovário de rata: variação cíclica e efeitos sobre a esteroidogênese**. 2000. 75f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2000.

CROCOMO, L.F. et al. Aspectos bioquímicos e ultraestruturas da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, p. 542-552, 2011.

CROCOMO, L.F. et al. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.4, p. 470-479, 2012.

DONOGHUE. M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASSELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin converting enzyme related carboxy peptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Cir Res**, v.87, p.E1-E2, 2000.

DUARTE, A.B.G.; CHAVES, R.N.; ARAÚJO, V.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, G.M.; LOPES, C.A.P.; TAVARES, L.M.T.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Follicular interactions affect the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p. 215-227, 2010.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.138-145, 1997.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**. v. 25, p.800-805, 1966.

FEITOSA, L. C. S.; VIANA, G. E. N.; REIS, A. M.; COSTA, A. P. R. Sistema renina-angiotensina ovariano. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.4, p.243-251, out./dez. 2010.

FEITOSA, L.C.S.; FERNANDES NETO, V.P.; BOAKARI, Y.L.; REIS, A.M.; VIANA, .E.N.; COSTA , A.P.R. Inibição da enzima conversora de angiotensina melhora a produção de embriões em cabras Boer superovuladas com hormônio folículo-estimulante suíno. **Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, n.19, p.211, 2011.

FELIX, D. et al. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). **Hypertension** Vol 17, No 6, Part 2 June 1991.

FERRARIO, C.M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v.30: p.535-541, 1997.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, E. L.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; et al. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.172-181, 2008.

FIGUEIREDO, José Ricardo de; RODRIGUES, Ana Paula Ribeiro; AMORIM, Cristiani Andrade; et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In:

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e 317 caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, n.16, Anais: Palestras. 2005.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproducton Science**, v.78, p.135-163, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM-IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371-379, 1996.

GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. **Embriologia**. 3 ed. Porto alegre: Artmed, 2012.

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

GIOMETTI, I. C.; et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1014-1025, 2005.

GONÇALVES, B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (org). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p.303-327.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; OLIVEIRA, Marcos Antônio Lemos de; MEZZALIRA, Alceu; et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (org). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 261-291

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.156-159, abr./jun. 2019.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E. et al. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p.951-961, 1999.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009

GRACE, J.A.; HERATH, C.B.; MAK, K.Y.; BURREL, L.M.; ANGUS, P.W. Update on new aspects of the rennin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options. **Clinical Science**, n.123, p.225-239, 2012.

GUEMRA, S.; MONZANI, E. S.; SANTOS, R.; et al. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com queracetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

GUERIN P. E. L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum. Reprod. Update**, v.7, p.175-189, 2001.

HAFEZ, E. S. E. Ciclos Reprodutivos. In: HAFEZ, E. S. E. (org). **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. p.

HARTWIG, F.P.; LISBOA, E.P.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v.81, p.340-346, 2014.

HEWITT, D.A; ENGLAND, G.C.W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v.143, p.590-591, 1998.

HONORATO-SAMPAIO, K.; PEREIRA, V.M.; SANTOS, R.A.S.; REIS, A.M. Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotropin-induced maturation in the rat preovulatory follicle. **Experimental Physiology**, n.97, v.5, p.642-650, 2012.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

HYTTEL, P. Gametogênese. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. (org). **Embriologia Veterinária**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p.32-55.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 29 fev. 2016.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAKAR, S. S.; SELLERS, J. C.; DEVOR, D. C.; MUSGROVE, L. C.; NEIL, J. D. Angiotensin II type-1 receptor subtypes cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.185, p.1090-1096, 1992.

KERE, M.; SIRIBOON, C.; LO, N. W.; NGUYEN, N. T. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v.59, p.78–84, 2013.

KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulose and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 100, p.151-6, 1994.

LANDIM-ALVARENGA, F. C; MAZIEIRO, R. R. D. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.150-158, Jul./Sept. 2014.

LANDIM-ALVARENGA, Fernanda da Cruz. Fecundação e Clivagem. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. (org.). **Obstetrícia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 1-16.

LEAL, M. C., et al. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. **J Anat**, v.214, n.5, p.736-43. 2009.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, p.76-86, 1979.

LEVY, R.R.; CORDONIER, H.; CZYBA, J.C. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. **Italian Journal Anatomy Embryology**, v. 106, n. 2, p. 101-108, 2001.

LI, Y.H., JIAO, L.H., LIU, R.H., CHEN, X.L., WANG, H., WANG, W.H. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, v. 61, p. 447–459, 2004.

LINDEMAN, R.E.; PELEGRI, F. Vertebrate maternal-effect genes: insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. **Mol. Reprod. Dev.**, v.77, p.299-313, 2010.

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

LONERGAN, P. et al. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.259–267, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** v.4, p.10.1–10.14, 2016.

LUCIANO, A. M. et al. The variable success of *in vitro* maturation: can we do better?, **Animal Reproduction**, v.15, (Suppl.1), p.727-736, 2018.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.437-443, 1996.

MACIEL, R. P.; MUZZI, R. A. L. A presença do sistema renina angiotensina em vários órgãos - Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. v. 20, 2013.

MAKAREVICH, A.V.; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with Insulin-like Growth Factor I during in vitro maturation and culture **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 386–392, 2002.

MAYER, L. P.; DEVINE, P. J.; DYER, C. A.; HOYER, P. B. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of Reproduction**, v.71, p.130-138, 2004.

McKINLEY, M.J.; ALBISTON, A.L.; ALLEN, A.M.; MATHAI, M.L.; MAY, C.N.; McALLEN, R.M.; OLDFIELD, B.J.; MENDELSON, F.A.O.; CHAI, S.Y. The brain rennin-angiotensin system: location and physiological roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n.35, p.901-918, 2003.

MELLO, R.R.C. et al. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.328-333, 2013.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S.L. et al. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões *in vitro* (PIVE). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.51-57, abr./jun. 2016.

MELLO, R. R. C.; MORAIS, M. E. O.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B. Taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de assincronia embrião-útero. **B Anim Husb**, v.73, p.88-93, 2016.

MINGOTI, G.Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do Soro Sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteroides**. 1999. 53p. Tese (Doutorado) Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1999.

MOGOLLÓN-WALTERO, E. M. et al. Sinalização por insulina durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.12-20, 2013.

MOTA, L. H. C. M. **Efeito da melatonina sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

MOUROT, A., RODRIGO, J., KOTZYBA-HIBERT, F., BERTRAND, S., BERTRAND, D., GOELDNER, M. Probing the reorganization of the nicotinic acetylcholine receptor during desensitization by time-resolved covalent labeling using [3H]AC5, a photoactivatable agonist. **Mol. Pharmacol.** v.69, p.452–461, 2006.

MOUSSA, Z.; EL-SHARIEF, M. A. M. S.; ABBAS, S. Y. New imidazolidineiminothione derivatives: Synthesis, spectral characterization and evaluation of antitumor, antiviral, antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 122, p. 419–428, 2016.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

NIELSEN, A.H.; SCHÄUSER, K. H.; SVENSTRUP, B.; POULSEN, K. Angiotensin Converting Enzyme in bovine ovarian follicular fluid and its relationship with oestradiol and progesterone. **Reprod Domest Anim**, v.37, p.81-85, 2002.

OBERMÜLLER, N.; GENTILI, M.; GAUER, S.; GRETZ, N.; WEIGEL, M.; GEIGER, H.; GASSLER, N. Immunohistochemical and mRNA Localization of the Angiotensin II Receptor Subtype 2 (AT2) in Follicular Granulosa Cells of the Rat Ovary. **J Histochem Cytochem**, v.52, p.545-548, 2004.

OLIVEIRA, M. KISSPEPTINA: Efeito na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. 2016. **Dissertação** (mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa De Pós Graduação Em Ciências Veterinárias, Universidade Federal De Uberlândia, Uberlândia.

PARK, S.H. et al. Effect of Bovine Follicular Fluid on Reactive Oxygen Species and Glutathione in Oocytes, Apoptosis and Apoptosis-related Gene Expression of In vitro Produced Blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.370-377, 2014.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq Gastroenterol**. V. 38 - no. 2 - abr./jun, p.138-144. 2001.

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**, New York, v.31, p.63-67, 1992.

PEPPERELL, J. R.; NEMETH, G.; YAMADA, Y.; NAFTOLIN, F.; MERINO, M. Localized accumulation of angiotensin II and production of angiotensin-(1-7) in rat luteal cells and effects on steroidogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.291, p.E221-E233, 2006.

PEREIRA, V.M.; SANTOS, R.A.S.; CASSALL, G.D.; HONORATO-SAMPAIO, K; REIS, A.M. Gonadotropin stimulation increases the expression of Ang-(1-7) and Mas receptor in the rat ovary. **Reproductive Sciences**, v.16, p.1165-1174, 2009.

PEREIRA, M. M.; COSTA, F. Q.; OLIVEIRA, A. P. et al. Quantificação de transcritos maternos em óócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1394-1400, 2010.

PERKEL, K. J. et al. The ART of Selecting the Best Embryo: A Review of Early Embryonic Mortality and Bovine Embryo Viability Assessment Methods. **Molecular Reproduction & Development**, v.82, p.822–838, 2015.

RATH, D.; JOHNSON, L. A. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. **Reprod Dom Anim**, v.43, p.338-346, 2008.

REIS, A.M.; VIANA, G.E.N.; PEREIRA, V.M.; SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7) in the rabbit ovary: A novel local regulator of ovulation. **Biology of Reproduction**, v.81, p.566, 2009.

REIS, F. M.,; BOUSSIQUET, D. R.,; PEREIRA, V.M.,; CAMARGOS, A.F.; REIS, A. M.; SANTOS, R. A. Angiotensin-(1–7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. **Fertil Steril** 95, 176–181, 2011.

RODRIGUES, V. S.; BRANCO, Y. N. T. C. C.; SILVA, J. H. L. et al. Produção in vitro de embriões bovinos em meio suplementado com captopril. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.626-628, out./dez. 2016.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl. Anat.**, v. 24, p.77-92, 1983.

SADEU, J.C., CORTVRINDT, R., RON-EL, R., KASTERSTEIN, E., SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured freeze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.85, n.1, p.1130-1141, 2006.

SAMPAIO, W.O. et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v.49, n.1, p.185- 192, 2007.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; SIMOES, E. S. A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp Physiol.** v. 93, p.519-27, 2008.

SANTOS T. J. et al. Molecular characterization and regulation of the angiotensinconverting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 12, n. 1, p. 1-8. 2011.

SCHAUSER, K. H.; NIELSEN, A. H.; WINTHER, H.; DANTZER, V.; POUSEN, K. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biol Reprod**, v.65, p.1672-1680, 2001.

SCHWARZ, K. L. **Atividade do sistema Oxido Nítrico sintase/oxido nítrico em oócitos bovinos**. 2007. 63f. Dissertação (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Mol Hum Reprod**, vol.8, p.612-618, 2002.

SILVA, J. R. V. **Growth factors in ovary goat sand the role of activing-A in the development of early-staged follicles**. 2005. 142f. Thesis (PhD) – Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, The Netherlands, 2005.

SILVA, C.M. G et al. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.4, p.233-242, 2010.

SILVA, A. A. A. **Efeito da quercetina na maturação in vitro de oócitos de caprinos nativos**. 2017. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2017.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.

SOUZA, B. G. G. F. **Ações da adição de *Morinda citrifolia* sobre os aspectos celulares e moleculares de complexos cumulus-oócito (CCOs) Bovinos durante Maturação in vitro**. 54f. 2019. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciência animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2019.

SOVERNIGO, T. C.; ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 00, p.1-9, 2017

STEFANELLO, J.R.; BARRETA, M.R.; PORCIUNCULA, P. M.; ARRUDA, J. N.; OLIVEIRA, J. F.; OLIVEIRA, M. A. Gonçalves PB. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**. v.66, p.2068-2076, 2006.

SUTOVSKY, P. et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1277-1287, 1993.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.

TIAN, X. et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 57, n. 3, p. 239–47, Oct. 2014.

VAN DEN HURK, R. J. ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.125-127, 2005.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA, G.E.N.; PEREIRA, V.M.; HONORATO-SAMPAIO, K.; OLIVEIRA, C.A.; SANTOS, R.A.S.; REIS, A.M. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Experimental Physiology**, v.96, n.9, p.957-965, 2011.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p.476-481, 2017.

VIANA, J. H. M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more *in vitro*-produced than *in vivo*-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer News**, v.36(4), p.8-25, 2018.

YANG, H.W.; HWANG, K.J.; KWON, H.C. et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Hum. Reprod.**, v.13, p.998-1002, 1998.

YOKOO, M.; SATO, E. Cumulus–oocyte complex interactions during oocyte maturation. **International Review of Cytology**, v. 91 p.235–251, 2004.

YOON, J.D.; YUBYEOL, J.A.; LIAN, C.A.; SEON-UNG, H.A.; EUNHYE, K.A.; EUNSONG, L.B.; DAE, Y.K.; SANG-HWAN, H. Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.83, p. 294-305, 2014.

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v.3, p.155-163, 1998.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; ODA, T.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S.; AKIBA, M.; YOSHINAGA, A.; NAKAMURA, Y. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production *in vitro* perfused rabbit ovaries. **Endocrinology**, v.133, p. 1609–1616, 1993.

YOSHIMURA, Y.; KARUBE, M.; AOKI, H.; ODA, T.; KOYAMA, N.; NAGAI, A.; AKIMOTO, Y.; HIRANO, H.; NAKAMURA, Y. Angiotensin II induces ovulation and

oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, p.1204-1211, 1996.

WANG, M.Y. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**. V.23, n.12, p.1127 -1141, 2002.

WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; SZYDŁOWSKI, M. et al. Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.97, p.334-343, 2007.

WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **Biol. Reprod.**, v.62, p.355-364, 2000.

WRENZYCKI, C; STINSHOFF, H. Maturation Environment and Impact on Subsequent Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, n.1, p. 38–43, 2013.

ZINI, S., et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.21, p.11968-73. 1996.