



Maturação *in vitro* de complexos *cumulus* oócitos caninos e bovinos

Canine and bovine *cumulus* oocyte complex *in vitro* maturation

RESUMO

Maturação oocitária é uma das etapas da produção *in vitro* de embriões (PIVE) nas espécies domésticas, na qual as fêmeas bovinas e caninas são submetidas a diferentes métodos para obtenção de complexos *cumulus* oócitos (CCOs), *in vivo* e ou *in vitro*. Após a aquisição desses CCOs, os mesmos são rastreados e avaliados inicialmente quanto às características morfológicas, podendo ser submetidos à testes mais precisos, principalmente no desenvolvimento de pesquisa. Neste sentido, marcadores de viabilidade no decorrer da maturação e ao término da mesma podem ser utilizados. Esta etapa executada com alto controle de qualidade visa índices de maturação compatíveis e satisfatórios aos processos de fertilização *in vitro* (FIV), os quais consistem no próximo passo para PIVE. A reprodução assistida (RA) nas espécies abordadas apresenta objetivos comuns quanto à maturação oocitária, no entanto, podem ser destinadas a fins diferentes quanto a aplicabilidade das técnicas e preservação do material genético. Nos cães, utilizados como modelo para PIVE de canídeos em extinção, o processo de maturação além de fisiologicamente distinto das demais espécies domésticas, tem um período de 72 horas, o que faz desta espécie um grande desafio nas taxas de maturação oocitária e subsequente PIVE quando comparadas com os bovinos.

Palavras-chave: Cadela; Vaca; Embrião; Ovário; Fertilização.

ABSTRACT

Oocyte maturation is one of the steps for *in vitro* embryo production in domestic species. Canine and feline females are submitted to different methodologies to obtain *Cumulus* Oocyte complex (COCs) *in vivo* and or *in vitro*. After COCs, recovering they are initially evaluated by morphological characteristics, and then submitted to precise tests during research development steps. Viability markers can be set during oocyte maturation and again after ended all process involved. The maturation must be done with maximal quality control, viewing compatible maturation index attending the satisfactory *in vitro* fertilization (IVF) process, which consists in the next step for *in vitro* embryo production. Assisted reproduction techniques (ART) for the referred species presents the same objective as far as maturation issues. However, the end points can be different regards the applicability of those techniques and genetic material preservation. Domestic dogs are used as model for extinction canine species, with a long physiologic process of oocyte maturation (72 hours period) when considering other domestic species. This difference makes the domestic canine oocyte, an enormous challenge as far as oocyte maturation index and subsequent *in vitro* embryo production when compared to cattle.

Keywords: Bitch; Cow; Embryo; Ovary; Fertilization.

J. C. O. S. Petry*

<https://lattes.cnpq.br/8787997389954872>

Embryofiv Laboratório de Fertilização *in vitro* Animal, Vilhena, RO, Brasil

G. H. Crippa

<http://lattes.cnpq.br/8119483052467640>

Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil

W. Boni

<http://lattes.cnpq.br/6691091444614326>

Programa de Mestrado Profissional em Produção Animal, Universidade Brasil, Descalvado, SP, Brasil

L. B. Latorraca

<https://orcid.org/0000-0002-0842-6319>

University College Dublin: Dublin, IE Irlanda

V. L. Scarabel

<http://lattes.cnpq.br/3552185782423793>

Universidade Brasil, Descalvado, SP, Brasil

C. M. B. Orlandi *

<https://orcid.org/0000-0001-7627-9202>

Programa de Mestrado Profissional em Produção Animal, Universidade Brasil, Descalvado, SP, Brasil

*Autor correspondente



1 Introdução

A presente revisão tem como objetivo abordar os aspectos envolvidos na competência dos CCOs das espécies caninas e bovinas, citando fatores determinantes para a eficiência de técnicas de reprodução assistida envolvendo ambas as espécies. Os CCOs possuem características únicas influenciadas pelo ciclo estral, resultando em maior ou menor competência oocitária durante os processos de maturação *in vitro*.

Técnicas desenvolvidas para a obtenção destas estruturas têm sido descritas literatura, envolvendo a abordagem dos ovários (gônadas femininas) e recuperação dos CCOs, inicialmente *in vivo* e *in vitro* na espécie bovina (GONÇALVES et al., 2001).

O uso dos oócitos de espécies domésticas para o entendimento da maturação *in vitro* de gametas contribui para o conhecimento e melhoria das técnicas de reprodução assistida em fêmeas ruminantes (EL-SOKARY et al., 2022; MASTROROCCO et al., 2021), conservação de animais em extinção como as espécies carnívoras, as quais utilizam ovários de fêmeas caninas e felinas domésticas como modelo (YOSHIDA et al., 2022; VIARIS DE LESEGNO, et al., 2008).

No entanto, independente do estágio ou condição reprodutiva dos ovários recuperados para as técnicas assistidas em cães, normalmente, há restrição de oócitos com potencial de desenvolvimento e maturação (RODRIGUES, et al., 2007). Já na espécie bovina, o processamento de ovários obtidos em abatedouro como fonte de recuperação de oócitos (células germinativas) tem sido amplamente utilizado como ferramenta e faz parte das rotinas em laboratório de PIVE (produção *in vitro* de embriões) comerciais e nos centros de pesquisa (GALLEGOS et al., 2022).

Embora os ovários possam ser utilizados como fonte de material biológico, amplamente disponível, uma vez oriundos de abatedouros no caso dos ruminantes e de remoção cirúrgica por meio das castrações (ovário – salpingo histerectomia OSH) de fêmeas caninas domésticas; este material pode sofrer influências de acordo com a raça, idade, nutrição, época do ano e sazonalidade. Tais fatores, sem dúvida, influenciam na competência, maturação oocitária e nos resultados da PIVE.

Inúmeros são os desafios para atingir taxas de maturação oocitária satisfatórias, embora na espécie canina, as dificuldades são ainda maiores, devido à característica natural do processo de maturação *in vivo* nesta espécie, o qual ocorre tardiamente (pelo menos 72 horas) dentro da tuba uterina após a ovulação (PEREIRA et al., 2012).

Ao serem removidos de dentro do folículo ovariano, para posterior processamento, os oócitos sofrem a retomada da meiose de forma espontânea e precoce, ainda que sem os estímulos dos hormônios gonadotróficos (SENGER, 2003).

Assim quando comparada à maturação *in vivo*, o oócito apresenta baixa capacidade de desenvolvimento, que é decorrente da assincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática



(SAKODA, 2018).

Na espécie bovina, o rastreamento e seleção dos CCOs são realizados após obtenção dos mesmos *in vivo*, por meio da punção ovariana com o auxílio de ultrassom (OPU), ou *in vitro* pelos métodos de fatiamento ou aspiração dos folículos ovarianos obtidos em abatedouro (GONÇALVES et al., 2001).

As sessões subsequentes abordarão aspectos únicos de cada espécie, proporcionando ao leitor conhecimento dos pontos críticos, os quais influenciam na competência oocitária das fêmeas caninas e bovinas.

2 Estado da Arte

Maturação *in vitro* dos Complexos *cumulus* oócitos na espécie canina

Estudos conduzidos envolvendo reprodução assistida em canídeos são provenientes de material oriundos de fêmeas em diversos estágios do ciclo estral (OTOI et al., 2001; HOSSEIN et al., 2007), assim como em diferentes condições reprodutivas (RODRIGUES; RODRIGUES 2003). Devido à escassez de material e dificuldade de estudar os processos reprodutivos em carnívoros selvagens e em extinção, o modelo experimental “ovários de fêmeas carnívoras domésticas” tem sido utilizado para o incremento das técnicas de reprodução assistida (COMIZZOLI et al., 2010; PAZ 2013).

A maturação *in vitro*, caracterizada por estabelecimento da meiose é atribuída a vários fatores relacionados às condições *in vivo* das doadoras (caninas) dos CCOs recuperados a partir de abordagens, como videocirurgias experimentais, cirurgias de rotina eletivas ou procedimentos como castrações (YAMADA et al., 1993; LUVONI et al., 2001; KIM et al., 2004).

O aporte de progesterona já presente na fase de estro na cadela e no diestro, com maior predominância, contribui mediando inúmeros eventos fisiológicos para maturação (KIM et al., 2005). A despeito da enorme colaboração e efeito da progesterona, sua queda gradativa durante a longa fase de diestro é acompanhada pela presença de prolactina (PRL), a qual exerce funções mitogênicas e morfogênicas, além de atividade secretória, apresentando funções bimodais, como funções circulatórias e envolvimento de citocinas (BEN-JONATHAN et al., 1996).

Em humanos, a PIVE tem se mostrado eficiente na presença de PRL nos folículos submetidos à aspiração, resultando em sucesso na fertilização e prenhez. Como a fase de diestro na cadela consiste em uma longevidade considerável, similar à gestação, é necessário notar a influência de tal hormônio (PRL) no desenvolvimento oocitário de CCOs obtidos durante esta fase (LAUFER et al., 1984).



Metabolismo, dimensões foliculares e oocitárias na competência dos CCOs de fêmeas caninas

Quanto às dimensões oocitárias, CCOs provenientes de fases do ciclo nas quais há aporte hormonal suficiente para presença de folículos maiores que 2mm (SONGSASEN; WILDT, 2005), com predominância de esteroides como progesterona e estrógeno, e, tais estruturas mostram-se responsivas aos procedimentos *in vitro* chegando à obtenção de embriões na fase de clivagem de 8 células (RODRIGUES et al., 2004; 2007).

Estes achados estão de acordo com os relatos de Songsasen; Wildt (2005), os quais demonstraram maior capacidade de desenvolvimento quando comparados a estruturas provenientes de folículos com antro folicular menores que 1mm.

Outro fator importante seria a capacidade metabólica de tais estruturas como o metabolismo via glicólise (WESSELOWSKI, 2008) e presença natural ou exógena de esteroides, influenciando diretamente na capacidade de maturação de oócitos *in vitro* (KIM et al., 2005).

A presença de folículos poliovulatórios nas cadelas, de certa forma, compoando uma porcentagem baixa de 14% da população folicular ovariana, dificulta a maturação e desenvolvimento de oócitos oriundos de tais estruturas (MİCLÄUŞ et al., 2007). A mínima possibilidade de ovulação espontânea de tais folículos e a escassez de estudos envolvendo o potencial de desenvolvimento de CCOs oriundos dos mesmos, demonstra apenas a existência deste evento fisiológico embora não justifique as taxas de maturação precárias nesta espécie (WALLNER, 2007).

Oócitos com dimensões inferiores 110µm de diâmetro mostraram fragmentação de DNA antes da maturação (ANGUITA et al., 2006). Desta forma, a idade da cadela, fase de puberdade e dimensões dos CCOs são cruciais para o estabelecimento da reprodução assistida nesta espécie, cujo passo inicial seria a classificação oocitária, baseada na sua origem, como: idade, fase do ciclo estral na fêmea, condições relacionadas às raças e características genéticas.

Sem dúvida, inúmeros fatores envolvendo questões metabólicas, mecanismos oxidativos e outras características como dimensões oocitárias, têm um papel fundamental nas respostas obtidas durante o processo de maturação *in vitro*. Neste sentido, estudos em cadelas demonstraram que a habilidade de maturação de oócitos caninos encontra-se entre dimensões de 61,5µm e 161,5µm (WALLNER, 2007).

Os estágios precoces de dimensões antrais e aqueles provenientes de folículos terciários, os quais contêm oócitos ao redor de 96µm, estão próximos às dimensões ideais atingidas (COMIZZOLI et al., 2010). Assim como nas demais espécies, oócitos >100µm são necessários para estabelecimento da meiose *in vitro*, retomada e completa maturação (HEWITT; ENGLAND, 1998; SRSEN et al., 1998; OTOI et al., 2000; SONGSASEN; WILDT, 2005).



De fato, nem todos os oócitos compatíveis com as características morfológicas são competentes (RODRIGUES; RODRIGUES, 2006), tendo comprometimento molecular e incapacidade de resultar em desenvolvimento embrionário satisfatório.

Questões atribuídas à expressão gênica nas células do *cumulus* e granulosa, assim como funções e disfunções genômicas, trazem explicações para a falta de competência oocitária a despeito da morfologia aparentemente normal em gametas caninos (SIRARD et al., 2007).

Alguns testes mais simples podem elucidar o estágio de maturação, desenvolvimento ou crescimento, assim definindo oócitos obtidos de material *in vivo* ou *in vitro*. Considerando tal possibilidade, tem-se como alternativa o teste *Brilliant cresyl blue* (BCB – azul de Cresil brilhante) (ALM, 2005). O teste é baseado na capacidade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), em converter o corante em aparência azul, ao ser absorvido por oócitos competentes, os quais terminaram o processo de crescimento fisiológico ou *in vitro*, resultando em BCB+, exibindo a cor azul, enquanto oócitos que apresentam redução de coloração azul, demonstram estar em crescimento ativo (WU, et al., 2007).

Em síntese, oócitos em crescimento contém G6PD, enquanto oócitos com crescimento finalizado apresentam diminuição de G6PD e não demonstram a coloração. Portanto, oócitos que ainda não completaram seu crescimento são passíveis de desenvolvimento e maturação *in vitro* de forma mais competente, sendo assim mais viáveis para a maturação *in vitro* e programas de reprodução assistida (WU, et al., 2007).

Finalmente, o fator idade é crucial para a competência oocitária na espécie canina, estudos demonstram o efeito da idade e do potencial de maturação de oócitos obtidos de cadelas jovens pré-púberes e deixam claro a menor competência dos mesmos. Tais oócitos são caracterizados por acúmulo de gotas de lipídeos no ooplasma, alto metabolismo energético, baixa síntese proteica e alta atividade transcricional nas células do *cumulus*, assim como deficiência em receptores para hormônios de crescimento (HAENISCH-WOEHL et al., 2003).

Maturação *in vitro* dos Complexos *cumulus* oócitos na espécie bovina

A capacidade de fecundação *in vivo* e desenvolvimento dos oócitos é maior do que a mesma *in vitro* (BLONDIN et al., 2002). Existem fatores que influenciam o crescimento dos oócitos e sua viabilidade, assim como a competência para o desenvolvimento *in vitro*. Tais fatores incluem: o tamanho folicular, pois não respondem adequadamente às condições *in vitro* e folículos com dimensões compatíveis à dominância (LONERGAN et al., 1994).

A morfologia dos CCOs apresenta grande importância na produção embrionária *in vitro*, com influência no processo de maturação. A classificação morfológica utiliza o parâmetro visual da



relação que existe entre a aparência das células do *cumulus* e o citoplasma do oócito (WANG; SUN, 2007).

O oócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do CCO. Morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo, com granulações finas, coloração marrom e completamente envolvidos por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta (GONÇALVES et al., 2002).

A capacidade de oócitos mamíferos em maturar *in vitro* está correlacionada com a atividade ovariana, o crescimento folicular e a presença ou ausência de células do *cumulus*, as quais formam os CCOs, sendo as mesmas, necessárias para o transporte de energia e a promoção da maturação do oócito bovino. A presença de células do *cumulus* circundando os oócitos parece ser mais importante para a maturação *in vitro* que até mesmo a atividade ovariana ou o tamanho folicular (SATO et al., 1977; FUKUI; SAKUMA, 1980).

As células do *cumulus* apresentam-se em policamadas compactas e, por ocasião da maturação, sob o estímulo dos hormônios LH e FSH entram em processo de expansão, interrompendo as comunicações com o oócito (HYTTEL, 1987, 1988; SZÖLLÖSI, 1991). Essas células, assim como as da granulosa, são essenciais para a nutrição, crescimento, divisão meiótica, maturação citoplasmática e fecundação do oócito (EPPIG, 1980; FUKUI; SAKUMA, 1980).

Nas células somáticas que envolvem o oócito, durante as maturações citoplasmática e nuclear, ocorrem modificações morfológicas específicas. As células do *cumulus* iniciam um arranjo na matriz extracelular, rica em ácido hialurônico, e tal fenômeno é denominado de expansão ou modificação das células do *cumulus* (EPPIG et al., 1982; BUCCIONE et al., 1990). *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).

Ao final da etapa de maturação, os oócitos precisam ser fecundados para que sejam capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Desta forma, deve ser feito o processamento do sêmen realizando-se uma seleção espermática e capacitação espermática. Após a capacitação dos espermatozoides, retira-se da estufa a placa de Petri contendo os ovócitos maturados e depositam-se os espermatozoides, sempre procurando proporcionar um ambiente adequado (GONÇALVES et al., 2002).

Estudos relatam que oócitos recuperados de folículos menores que 6 mm apresentam distribuição irregular de grânulos corticais, sistema defeituoso de exocitose, maiores anormalidades



na fertilização e, portanto, não são capazes de sustentar o desenvolvimento embrionário (CRAN e CHENG, 1986; HYTTEL et al., 1986; SHABANKAREH et al., 2015). No entanto, outros estudos demonstraram a capacidade de expansão das células do *cumulus* aspirados de folículos menores que 6 mm, indicando certo potencial a ser considerado quanto à utilização para FIV (PETRY, 2021; PETRY et al 2020).

Nas avaliações morfológicas dos CCOs, deve-se observar a quantidade e a compactação das células do *cumulus* e a homogeneidade do citoplasma como descrito a seguir. Grau I (GI): os CCOs apresentam citoplasma homogêneo, com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do *cumulus*; Grau II (GII): também apresentam pequenas áreas de pigmentação irregular e *cumulus* compacto; Grau III (GIII): os oócitos apresentam o citoplasma heterogêneo/vacuolizado, com pelo menos três camadas de células do *cumulus* e/ou com pequenas áreas desnudas, e o Grau IV ou Desnudo (GIV): o oócito apresenta citoplasma heterogêneo e pigmentado, com células *cumulus* completamente/parcialmente ausente ou expandido (BLONDIN; SIRARD, 1995; SIRARD et al., 2006).

Considerados os mais competentes para o uso na FIV, os CCOs Grau I apresentam maior taxa de desenvolvimento embrionário pós-fertilização. Em contrapartida os que são menos competentes para a produção *in vitro* de embriões, são os CCOs Grau IV. Os CCOs Grau II e III são também aceitos, embora este último possa ser descartado, dependendo do procedimento e rendimento dos oócitos obtidos. No uso da PIV de embriões bovinos, é recomendado o uso de CCOs Grau I e II (SIRARD et al., 2006). Várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos, na tentativa de identificar àqueles com maior potencial. De acordo com Leibfried; First (1979), os oócitos podem ser classificados em escala de 1 a 4, considerando as características do *cumulus* e do citoplasma do oócito (ooplasma). A classificação dos autores encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação morfológica dos complexos *cumulus* oócitos bovinos.

Oócitos	Descrição
Grau 1	<i>Cumulus</i> 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 2	<i>Cumulus</i> compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura, preenchendo o espaço do interior da zona pelúcida;
Grau 3	Espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado;
Grau 4	Oócito desnudo ou sem <i>cumulus</i> .



Fonte: Modificado de Leibfried; First (1979).

Outras classificações quanto à morfologia e qualidade dos oócitos foram descritas (LOOS et al, 1991 & TETZNER, 2007) e encontram-se na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2 - Classificação do grau de qualidade de acordo com as características dos complexos *cumulus* oócito.

Oócitos	Descrição
Grau I	Revestimento com multicamadas de <i>cumulus</i> compacto, ooplasma homogêneo e complexo <i>cumulus</i> -oócito claro e transparente;
Grau II	Revestimento com 3 a 5 camadas de <i>cumulus</i> compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
Grau III	Pouco revestimento de células do <i>cumulus</i> (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose
Grau IV	Ou atrésico: <i>cumulus</i> expandido com células escuras e em grumos, e complexo <i>cumulus</i> -oocitário escuro e irregular
Desnudo	Sem camadas do <i>cumulus</i> e com ooplasma uniforme ou com granulações

Fonte: Modificado de Loos et al. (1991); Tetzner (2007)

O oócito passa por uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas concomitantes ao seu crescimento, durante o período que compreende o início do pico de LH e a ovulação, o que influenciam diretamente na maturação (VAN DEN HURK, 2012).

Os oócitos selecionados devem apresentar competência para sustentar o processo de desenvolvimento embrionário (BREVINI; GANDOLFI, 2001), sendo tal competência meiótica, adquirida durante a foliculogênese, coincidindo com a formação do antro (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

A competência meiótica está relacionada ao tamanho do oócito, o qual também está relacionado com o tamanho folicular. Para completarem a maturação nuclear até o estágio de metáfase II, os oócitos bovinos precisam ter diâmetro de 110µm (ARMSTRONG, 2001; BLANCO et al., 2011).

A pré-maturação e maturação oocitária envolvem eventos que ocorrem desde o estágio de vesícula germinativa até o término da segunda divisão meiótica, com formação do segundo corpúsculo polar (BLANCO et al., 2011).

Diferente da maturação *in vivo*, os oócitos que são maturados *in vitro* geralmente apresentam o metabolismo alterado, com um reduzido potencial de desenvolvimento, sendo afetado pelos seguintes fatores: deficiências dos meios de maturação, a habilidade intrínseca do oócito, ou ambos, sendo a disponibilidade de nutrientes e enzimas mediados por sistema de homeostase. A regulação da (KRISHER, 2004). Portanto, a seleção dos oócitos para a maturação *in vitro* é importante,

considerando a classificação morfológica e critério para a seleção durante o processo de rastreamento (GONÇALVES et al., 2001).

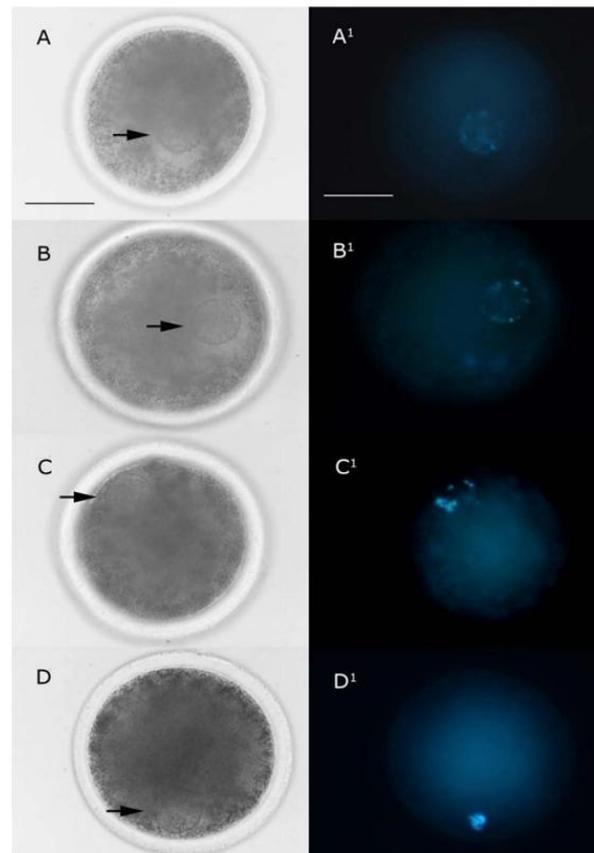
Os oócitos bovinos coletados a partir de folículos antrais médios apresentam quatro padrões de configuração de cromatina na vesícula germinativa, de VG0 a VG3, caracterizada pelo aumento progressivo da condensação, silenciamento transcricional, metilação global do DNA e acetilação progressiva de histona H4.

Dessa forma, o estágio VG0 mostra um padrão filamentososo difuso de cromatina em toda a área nuclear; o VG1 e o VG2 representam estágios iniciais e intermediários, respectivamente, da remodelação da cromatina, iniciando o aparecimento de poucos focos de condensação em VG1 e prosseguindo com a formação de aglomerados distintos de cromatina condensada em VG2. O VG3 é o estágio no qual o mais alto nível de condensação é alcançado, com a cromatina organizada em um aglomerado único (Figura 1) (LUCIANO et al., 2014).

Baseando-se nas classificações e remodelações, tem-se que os estágios VG2 e VG3 apresentam maior competência para o desenvolvimento, devido à maior carga de transcritos adquiridos durante a maturação nuclear (SAKODA, 2018).

O conhecimento da dinâmica de evolução das fases de vesícula germinativa mediante os intervalos necessários para o processamento dos CCOs e coleta de folículos dos ovários é essencial para o adequado desempenho das técnicas *in vitro*. Tais CCOs podem sofrer perdas de capacidade de desenvolvimento no decorrer do processamento, mesmo a despeito da continuidade de estímulos hormonais durante a próxima fase de maturação.

Figura 1 - Imagens de microscopia de luz e de fluorescência após a marcação de oócitos bovinos com sonda Hoechst 33342.



Fases de vesícula germinativa: VG0 (A, A¹), VG1 (B, B¹), VG2 (C, C¹) e VG3 (D, D¹). Setas indicam o envelope nuclear. Barra de escala: 50 μ m. Fonte: modificado de Luciano et al. (2014).

Mecanismos relacionados à deficiência em transporte de glicose e tradução proteica ineficiente foram sugeridos a partir de estudos envolvendo maturação de oócitos provenientes de fêmeas bovinas pré-púberes (WRENZYCKI et al., 2007).

Quanto a influência de genes H2A, FSHR e GHR na competência oocitária durante a maturação, o tamanho folicular foi associado especificamente ao gene H2A e a histona. Os oócitos recuperados de folículos maiores que 6 mm apresentaram níveis mais baixos de H2A transcritos e histonas específicas de oócitos. Portanto, competência de desenvolvimento de oócitos foram comprometidas (CAIXETA et al., 2009) e apresentam atraso no desenvolvimento celular nos estágios de embriões (LEQUARRE et al., 2005).

Os oócitos recuperados a partir de folículos maiores ou iguais a 6 mm, os folículos apresentaram melhores resultados em termos de qualidade e competência de desenvolvimento *in vitro* (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994). As variações nas dimensões foliculares levam às diferentes respostas *in vitro* quanto a competências de maturação e desenvolvimento (HENDRIKSEN et al., 2000). Assim, o tamanho dos folículos dos quais os oócitos são recuperados é um fator chave na PIVE (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; CROZET et al., 1995; CAIXETA et al., 2009).



Acredita-se que o mecanismo pelo qual o rendimento de blastocisto é menor em oócitos maturados submetidos à PIVE e provenientes de folículos pequenos, seria pelo atraso na cavitação embrionária e nos estágios de crescimento, os quais mostram-se retardados dentro do ciclo celular (LEQUARRE et al., 2005).

Outros autores elucidaram mecanismos relacionados às ondas de crescimento folicular, as quais possuem fases distintas (recrutamento, divergência e dominância), sendo a fase de recrutamento e possivelmente o final da fase de regressão de folículos dominantes que não ovulam, correspondentes à presença de folículos maiores que 3mm (GINTHER et al., 2000).

Ainda seguindo esta linha de raciocínio, durante o diestro, com a presença do CL, a progesterona predomina em relação ao estrógeno, o qual é fundamental para os fatores que sinalizam o início da maturação (COUTINHO et al., 2007).

Neste caso, a relação estrógeno: progesterona influencia no processo de regressão e atresia folicular, podendo agir negativamente na maturação, estando esses folículos menores (folículos < 3 mm) quando aspirados, já em processo de atresia e programados para a morte celular, caracterizada por apoptose (COUTINHO et al., 2007).

3 Considerações finais

As espécies caninas e bovinas são amplamente utilizadas no que diz respeito às técnicas de reprodução assistida, seja para fins de produção em escala ou como modelo para preservação de material genético em caso de canídeos em extinção. Portanto, as informações presentes nesta revisão podem auxiliar nas rotinas laboratoriais com o uso de ovários de abatedouro ou mesmo adquiridos *in vivo* em ambas as espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, H.; TORNER H.; LOHRKE, B.; VIERGUTZ, T.; GHONEIMB, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2194-2205, 2005.

ANGUITA, B.; VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; SOOM, A.V. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. **Theriogenology**, v. 67, n.3, p. 537-549, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X06004882?via%3Dihub>. Acesso em: 3 out. 2021. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.004.

ARMSTRONG, D. T. Effect of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v.55, n. 6, p.1303-1322, 2001.



BEN-JONATHAN, N.; MERSHON, J.L.; ALLEN, D.L.; STEINMETZ, R.W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. **Endocrine Reviews**, v. 17, n.6, p. 639-669, 1996. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article/17/6/639/2195005>. Acesso em: 29 set. 2021. DOI: 10.1210/edrv-17-6-639

BLANCO, M. R.; DEMYDA, S.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO, E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.7, p.155-165, 2011. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-full-text-pdf/F83296011816.pdf> . Acesso em: 20 jul. 2017.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGO, H. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.38-43, 2002.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v.41, n.1, p. 54-62, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>. Acesso em: 15 jul. 2017.

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE MAN. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental. competence. **Reproduction Fertility and Development**. 2009;21(5):655-64. <http://dx.doi.org/10.1071/RD08201>. PMID:19486602.

CARVALHO J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus x Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. v. 69, p. 167–175, 2008.

CHACUR, M.G.M.; VALENTIM, N.C.; MARTINEZ, A.I.S. et al. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.1, p.65-70, 2006.

COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. **Cancer Treatment and Research**, v. 156, p. 87-100, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086462/>. Acesso em: 11 set. 2021. DOI:10.1007/978-1-4419-6518-9_7

COUTINHO, G.T.R.M.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F. et al. Avaliação ultrassonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1089-1096, 2007.

CRAN, D.; CHENG, W.T.K. The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. **Gamete Research**. 1986;13(3):241-51. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1120130307>.

CROZET N, AHMED-ALI, M.; DUBOS, M. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility** 1995;103(2):293- 8. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1030293>. PMID:7616502



- DAEN, F.P.; SATO, E.; NAITO, K.; TOYODA, Y. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pro nucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.667–673, 1994.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.138-145, 1997.
- EL-SOKARY, M.M.M.; SHEHATA, S.F.; MAHMOUD, K.G.M. Heparin and Progesterone Exert Synergistic Effects to Improve the In-Vitro Fertilization Rate of Bovine Sperm Bound to Oviduct Cell Aggregates from the Isthmus. **Veterinary Sciences**. 2022, 9, 372. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070372>.
- EPPIG, J. J. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.23, p.545-552, 1982.
- ERICKSON, B.H. 1966. Desenvolvimento e senescência do ovário bovino pós-natal. **Journal of Animal Science**, 25:800-805.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion. Statement on the use of animal-based parameters to assess the welfare of animals. **European food safety authority FSA Journal**, v.10, p.2767, 2012. [8]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria.html> . Acesso em: 24 abr.2020
- EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. O desenvolvimento folicular e a terapia hormonal em novilhas a partir de 2 a 36 semanas de idade. **Journal of Reproduction and Fertility**.1994.
- FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**.São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. p. 195-226, 2001.
- GALLEGOS, F.; MANCHENO, A.; MENA, L.; MURILLO, A. Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art. **ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.**, v.2, n.1, p.172–185, 2022. DOI 10.18502/epoch.v2i2.11192
- GINTHER, J.O.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. A seleção do folículo dominante em bovinos. **Biology of Reproduction**, v.55, 2005.
- GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; GONÇALVES, B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.
- HAENISCH-WOEHL, A.; KÖLLE, S.; NEUMÜLLER, C.; SINOWATZ, F.; BRAUN, J.; Morphology of Canine Cumulus–Oocyte Complexes in Pre-pubertal Bitches. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 32, n.6, p. 373-377, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.0340-2096.2003.00514.x>. Acesso em: 2 out. 2021. DOI: 10.1046/j.0340-2096.2003.00514.x
- HENDRIKSEN, P.; VOS, P.; STEENWEG, W.; BEVERS, M.; DIELEMAN, S. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**. 2000, v.53, n.1, p.11-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00236-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00236-8). PMID:10735058.



HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p.123-139, 1998. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432097000833?via%3Dihub>. Acesso em: 4 out. 2021. DOI: 10.1016/s0378-4320(97)00083-3

HOSSEIN, M.S.; KIM, M.K.; JANG, G.; OH, H.J.; KOO, O.; KIM, J.J.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effects of thiol compounds on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n.9, p. 1213-1220, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20674>. Acesso em: 2 out. 2021. DOI: 10.1002/mrd.20674

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

KIM, M. K.; FIBRIANTO, Y. H.; OH, H. J.; JANG, G.; KIM, H. J.; LEE, K. S.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Effects of estradiol-17beta and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, n.5, p. 1342-1353, 2005.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X04002390?via%3Dihub>. Acesso em: 24 set. 2021. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.07.019

KIM, M.K.; FIBRIANTO, Y.H.; OH, H.J.; JANG, G.; KIM, H.J.; LEE, K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effect of B-mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n.3, p. 253-258, 2004. Disponível em:

<https://vetsci.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2004.5.3.253>. Acesso em: 24 set. 2021.

DOI:10.4142/jvs.2004.5.3.253.

LAUFER, N.; BOTERO-RUIZ, W.; DECHERNEY, A.H.; HASELTINE, F.; POLAN, M.L.; BEHRMAN, H.R. Gonadotropin, and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized *in vitro*. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 58, n.3, p. 430-434, 1984. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/58/3/430/2675570?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 24 set. 2021. DOI: 10.1210/jcem-58-3-430

LEIBFRIED, 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.

LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, n.63, v.3, p.841-59. 2005; <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.015>. PMID:15629802

LONERGAN P, MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Mol Reprod Dev.**, v.37, n.1, p.48-53, 1994.

<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080370107>. PMID:8129930

LUCIANO, A.M.; F. FRANCIOSI; C. DIECI, I; TESSARO, L; TERZAGHI, S.C.; MODINA, V. LODDE. Large-scale chromatin structure and function changes during oogenesis: the interplay



between oocyte and companion cumulus cells. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.141-149, Jul./Sept. 2014.

LUVONI, G.C.; LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; GANDOLFI, F. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 57, p. 141-146, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11787141/>. Acesso em: 23 set. 2021.

MASTROROCCO, A.; CACOPARDO, L.; LAMANNA, D.; TEMERARIO, L.; BRUNETTI, G.; CARLUCCIO, A.; ROBBE, D.; DELL'AQUILA, M.E. Bioengineering Approaches to Improve In Vitro Performance of Prepubertal Lamb Oocytes. **Cells**, v.10, p.1458, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10061458>

MICLĂUȘ, V.; GROZA, I.; OANA, L. Domestic cat (*Felis catus*) polyovular follicles. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. **Veterinary Medicine**, v. 64, n.1-2, p. 473-478, 2007. Disponível em: <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/view/2476/2297>. Acesso em: 3 out. 2021.

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KARJA, N.W.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 13, n.2-3, p. 151-155, 2001. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/rd/RD00098>. Acesso em: 2 out. 2021. DOI: 10.1071/rd00098

PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994). PAVLOCK A, Lucans H, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.63-67, 1992.

PAZ, R.C.R. **Reprodução de Felinos Domésticos e Selvagens**. Cuiabá: Ed. UFMT, 2013.

PEREIRA, L.M.C.; BICUDO, S.D.; LOPES, M.D. Oocyte maturation in bitches. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.205-209, 2012.

PETRY JC.O.S. **Expansão das células do cumulus e Produção in vitro de embriões em vacas das raças Nelore e Greyman**. Dissertação (Programa de mestrado *stricto sensu* profissional em Produção Animal). 2021. F 91, Universidade Brasil, Descalvado, SP. 2021.

PETRY, J.C.O.S.; BONI, W.; BIONDO, T.F.; PETRY, I.; ORLANDI, C.M.B.O. Expansão das células do cumulus de oócitos bovinos em folículos com diferentes dimensões na ausência ou presença de corpo lúteo. In: **I CONTEC BRASIL – Congresso acadêmico e tecnológico da Universidade Brasil**, VII Encontro de Pós-graduação, 4 a 5 de dezembro de 2020, São Paulo.

RODRIGUES, B.A.; DOS SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.L. Effect of maturation medium on *in vitro* cleavage of canine oocytes fertilized with fresh and cooled homologous semen. **Zygote**, v. 15, p. 43-53, 2007. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/abs/effect-of-maturation-medium-on-in-vitro-cleavage-of-canine-oocytes-fertilized-with-fresh-and-cooled-homologous-semen/7B5859658460CE764CA14D0BD7EEADF5>. Acesso em: 12 set. 2021. DOI: 10.1017/S0967199406003960.

RODRIGUES, B.A.; DOS SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.L. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n.2, p. 215-223, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.10394>. Acesso em: 12 set. 2021. DOI: 10.1002/mrd.10394



RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**, v. 60, n.1, p. 59-66, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X02013018?via%3Dihub>. Acesso em: 12 set. 2021. DOI:10.1016/s0093-691x(02)01301-8

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Responses of canine oocytes to *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization outcome. **Theriogenology**, v. 66, n.6-7, p. 1667-1672, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X06001130?via%3Dihub>. Acesso em: 12 set. 2021. DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.02.017

SAKODA, J. N. **Characterization and control of the oocyte population in Nelore cattle based on chromatin configuration**. 2018. Dissertação - Biotecnologia Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Botucatu, SP. 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/165182>, Acesso em: 20 fev.2021.

SATO, A. SARENTONGLAGA, B.; OGATA, K.; YAMAGUCHI, M.; HARA, A.; ATCHALALT, K.; SUGANE, N.; FUKUMORI, R.; NAGAO, Y. Effects of insulin-like growth factor-1 on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 1, p. 83-88, 2018. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/64/1/64_2017-145/_article. Acesso em 2 out. 2021. DOI: 10.1262/jrd.2017-145

SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**. Supplement, v. 68, n.1, p. 71-76, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07002762?via%3Dihub>. Acesso em: 2 out. 2021. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.053

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n.1-2, p. 2-22, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868673/#>. Acesso em 11 set. 2021. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.10.004

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n.1, p. 113-119, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20330>. Acesso em 11 set. 2021. DOI:10.1002/mrd.20330

TAKUMI YOSHIDA, M.D.; EMTIAJ, A.; KEISUKE, H.; YASUNORI, T.; MASAYA, T.; RYOJI, K.; TOSHIO, I.; KIKUYA, S.; SHINGO, H. Effects of the preservation medium and storage duration of domestic cat ovaries on the maturational and developmental competence of oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v. 68, n. 2, 2022.

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

WALLNER, S.E. **Untersuchungen zur Oozytenreifung beim Hund**. 2007. Thesis Munich, Germany: Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians Universität. 2007. Disponível em: https://edoc.ub.uni-muenchen.de/7323/1/Wallner_Sandra_Elisabeth.pdf. Acesso em: 4 out. 2021.

WANG, Q.; SUN, Q.Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.1-12, 2007.



WESSELOWSKI, S. **Metabolic analysis of glucose, pyruvate and glutamine in dog oocytes collected from different sized follicles and matured *in vitro***. 2008. Thesis (Master of Science in Veterinary Medicine) – Kansas State University, Manhattan, Kansas, 2008. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/5164837.pdf>. Acesso em: 4 out. 2021.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMAN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**. Supplement, v. 68, p. 77-83, 2007. Disponível em: Acesso em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07001756?via%3Dihub>. 24 set. 2021. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.028

WU, Y.G.; LIU, Y.; ZHOU, P.; LAN, G.C.; HAN, D.; MIAO, D.Q., TAN, J.H. Selection of oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. **Cell Research**, v. 17, p. 722-731, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cr200766#citeas>. Acesso em: 2 out. 2021.