

Produção *in vitro* de embriões partenogênicos a partir de oócitos caprinos criopreservados: revisão de literatura

In vitro production of parthenogenetic embryos from cryopreserved goat oocytes: literature review

Producción *in vitro* de embriones partenogênicos a partir de ovocitos de cabra criopreservados: revisión de la literatura

Recebido: 12/01/2023 | Revisado: 24/01/2023 | Aceitado: 25/01/2023 | Publicado: 28/01/2023

Marlene Sipaúba de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6675-023X>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: peessoasipauba@yahoo.com.br

Letícia Soares de Araújo Teixeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1630-6904>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: leticiasoateixeira@gmail.com

Kenney de Paiva Porfírio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5195-0434>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: kenney@ufpi.edu.br

Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0071-4030>

Universidade Estadual do Ceará, Brasil

E-mail: cristiane.mello@uece.br

Jose Ferreira Nunes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1189-0937>

Universidade Estadual do Ceará, Brasil

E-mail: nunesuece@gmail.com

Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-1694>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: lysbarradas@yahoo.com.br

Janaina de Fátima Saraiva Cardoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4484-4403>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: janainadefatima@hotmail.com

Ney Rômulo Oliveira Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0484-3748>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: neyromulo@ufpi.edu.br

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores, com diferentes etapas: colheita e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fecundação *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos até ao estágio de blastocisto. A PIV, em conjunto com a criopreservação de oócitos e embriões, pode permitir a comercialização de embriões em larga escala, o transporte de embriões livres de patógenos e transações comerciais de germoplasma mais fáceis e baixos custos. Porém, não é efetivo devido a vários fatores relacionados a evolução no processo. Estudos visam facilitar o uso de oócitos por razões biológicas, comerciais e melhor aproveitamento celular. Foi realizada uma revisão narrativa da literatura, por meio de artigos científicos, dissertações, teses e livros publicados nas bases de dados: Scopus, PubMed, Scielo e Google acadêmico, com o objetivo de fornecer uma perspectiva geral dessa biotécnica em caprinos com ênfase na descrição enfatizando as principais metodologias atualmente utilizadas para colheita de oócitos, MIV, FIV e CIV de embriões.

Palavras-chave: Oócitos; PIV; Caprino; Partenogênese.

Abstract

The *in vitro* embryo production (PIV) is a biotechnique used, alternatively, to accelerate the production of genetically superior animals, with different stages: collection and *in vitro* maturation of oocytes, *in vitro* fertilization, *in vitro* culture from zygotes to the blastocyst stage. PIV, in conjunction with oocyte and embryo cryopreservation, may

enable large-scale commercialization of embryos, transport of pathogen-free embryos, and easier and lower-cost germplasm commercial transactions. However, it is not effective due to several factors related to the evolution of the process. Studies aim to facilitate the use of oocytes for biological and commercial reasons and better cell utilization. A narrative review of the literature was carried out, through scientific articles, dissertations, theses and books published in the databases: Scopus, PubMed, Scielo and Google Scholar, with the aim of providing an overview of this biotechnique in goats with emphasis on the description emphasizing the main methodologies currently used for oocyte collection, IVM, IVF and IVC of embryos.

Keywords: Oocytes; PIV; Goat; Parthenogenesis.

Resumen

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar la producción de animales genéticamente superiores, con diferentes etapas: recolección y maduración *in vitro* (IVM) de ovocitos, fertilización *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (GIC) desde los cigotos hasta el estadio de blastocisto. PIV, junto con la criopreservación de ovocitos y embriones, puede permitir la comercialización a gran escala de embriones, el transporte de embriones libres de patógenos y transacciones comerciales de germoplasma más fáciles y económicas. Sin embargo, no es efectivo debido a varios factores relacionados con la evolución del proceso. Los estudios tienen como objetivo facilitar el uso de ovocitos por razones biológicas y comerciales y una mejor utilización de las células. Se realizó una revisión narrativa de la literatura, a través de artículos científicos, disertaciones, tesis y libros publicados en las bases de datos: Scopus, PubMed, Scielo y Google Scholar, con el objetivo de brindar un panorama de esta biotécnica en caprinos con énfasis en la descripción. haciendo énfasis en las principales metodologías utilizadas actualmente para la recolección de ovocitos, IVM, IVF y IVC de embriones.

Palabras clave: Ovocitos; PIV; Cabra; Partenogénesis.

1. Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores, impedir o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões, também pode minimizar problemas como: baixas taxas de fecundação, ocorrência prematura do corpo lúteo e altos custos relativos a procedimentos cirúrgicos. (Gonçalves, 2002; Baldassare & Karatzas, 2004).

Com os avanços das pesquisas nos últimos anos houve uma grande revolução no campo das biotecnologias reprodutivas. Algumas dessas técnicas aumentam a seleção diferencial, como a inseminação artificial, a transferência de embriões, transgênese e clonagem, enquanto outras aceleram o progresso encurtando, o intervalo entre gerações, como a produção *in vitro* de embriões a partir de animais pré-púberes (Baldassarre & Karatzas, 2004, Paramio & Izquierd, 2016).

A produção *in vitro* de embriões caprinos não é efetivo devido a vários fatores relacionados a evolução no processo de maturação, fertilização, cultivo e criopreservação. Estudos visam facilitar o uso de oócitos, por razões biológicas e comerciais, que consistem no armazenamento e na preservação de material biológico, importante na disseminação de material genético de animais de raças especializadas e um fator crucial para o melhor aproveitamento da caprinocultura (Cognié, 2003; Paramio & Izquierd, 2014).

Atualmente, há um crescente interesse em compreender os mecanismos envolvidos no crescimento folicular, maturação, ativação, fertilização e cultivo oócitos após criopreservação (Hemamalini et al., 2003). No entanto, o sucesso dessa técnica depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, que envolve tanto questões físicas, como o volume da solução de criopreservação e as taxas de resfriamento; quanto as questões químicas referentes à composição da solução de criopreservação. Além disso, para reduzir ou evitar as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas é essencial a adição de substâncias que proporcionem uma crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura (Vajta, 2007; Suresh et al., 2021).

Portanto, sabendo-se das particularidades das biotécnicas na reprodução, sobretudo as dificuldades na reprodução assistida, são de grande valia estudos para elucidar aspectos que possam aumentar a eficiência em cada etapa do sistema de

produção *in vitro* de embriões caprinos. A produção *in vitro* de embriões, em conjunto com a criopreservação de embriões, pode permitir a comercialização de embriões em larga escala, o transporte de embriões livres de patógenos e transações comerciais de germoplasma mais fáceis e baratas. No entanto, ainda são poucas as pesquisas sobre a PIV em caprinos em comparação com outras espécies de produção. O objetivo desta revisão bibliográfica é fornecer uma visão geral do estado da arte da PIV em caprinos com ênfase na descrição das principais metodologias atualmente utilizadas para colheita e criopreservação de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), partenogênese, cultivo *in vitro* (CIV) e apresentar as perspectivas da pesquisa nesta biotécnica.

2. Metodologia da Pesquisa

Este trabalho trata-se de uma revisão narrativa descritiva sobre o tema, produção *in vitro* de embriões partenogenéticos a partir de oócitos caprinos criopreservados, com destaque nas principais metodologias aplicadas a partir das colheitas de oócitos até a produção do embrião pronto p ser inoculado. Para isso foram pesquisados livros, artigos acadêmicos, dissertações e teses publicados e disponíveis nas bases de dados como: Scopus, Scielo, PubMed e Google acadêmico. Para a localização destes trabalhos foram utilizadas as determinadas expressões: PIV, oócitos caprinos, criopreservação, partenogênese e eram escritas na língua portuguesa e/ou na língua em inglesa, e descartados aqueles trabalhos que não descreviam temas referentes ao tema (Estrela, 2018).

3. Métodos de Obtenção e Classificação de Complexos *cumulus*-oócitos

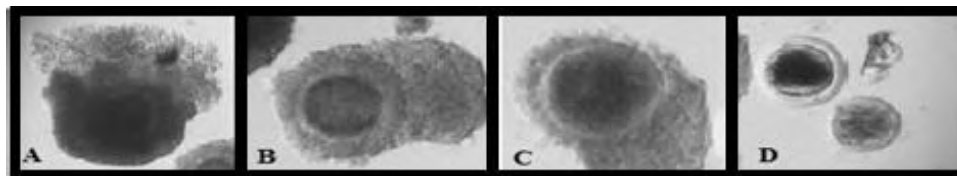
Na produção *in vitro* de embriões a obtenção dos complexos *cumulus*-oócitos é uma etapa de grande importância e tem como principal fonte a punção de folículos ovarianos oriundos de abatedouros (Gonçalves et al., 2008; Paramio e Izquierd, 2016; Damaceno, 2017).

Em pequenos ruminantes os oócitos podem ser obtidos *in vitro*, a partir da aspiração folicular (Slavik et al., 1992; Samake et al., 2000), dissecação folicular (Fukui et al., 1988) ou *slicing* (fatiamento) dos ovários (Samake et al., 2000). *In vivo*, a obtenção dos complexos *cumulus*-oócitos, ocorrem por laparotomia, *ovum pick-up* guiada por laparoscopia (LOPU) ou ainda por *ovum pick-up* via transvaginal guiada por ultrassonografia (Graff et al., 1999; Baldassarre et al., 2002). Dentre esses métodos a LOPU é o que tem demonstrado maior relevância, pois pode ser realizado várias vezes na mesma doadora, causa pouco trauma, rápida realização e com boa taxa de recuperação de oócitos (Baldassare et al., 2002, 2003, 2012, 2016).

A seleção é realizada após avaliação do *cumulus* e do citoplasma (ooplasma) do oócito, variando de grau I a IV e a avaliação morfológica é efetivada pelo uso de um estereomicroscópio (Muller, 2015).

Classificação dos oócitos segundo Stringfellow e Givens (2010): grau I: Oócitos com *cumulus* compacto e mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom; grau II: Oócitos com menos de três camadas de células do *cumulus oophorus*. 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. O ooplasma preenche todo espaço interior da zona pelúcida; grau III: Oócitos que possuem o *cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado; grau IV: Oócitos desnudos sem células do *cumulus*, citoplasma com cor e granulação anormais ou com células expandidas com aspectos apoptóticos, como por ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Classificação de complexos *cumulus oócit*os. **A:** grau I; **B:** grau II; **C:** grau III; **D:** grau IV.



Fonte: Stringfellow e Givens (2010).

Em caprinos e ovinos são selecionados para maturação apenas aqueles oócitos sem expansão das células do *cumulus*, com citoplasma uniforme, levemente granulado e coloração homogênea (Nunes et al., 2010).

4. Criopreservação e Crioinjúrias

A criopreservação consiste na conservação do material biológico, por tempo indefinido, a temperaturas negativas de -196°C em nitrogênio líquido (Rubinsky, 2003, Silva et al., 2021).

De acordo com Igor (2012), para obtenção de sucesso na estocagem são necessários os seguintes critérios: a) o metabolismo celular deve permanecer de forma reversível; b) manter a integridade estrutural da célula; c) obter boas taxas de células sobreviventes após descongelação; d) após descongelação manter competência para desenvolvimento; e) aplicação de técnicas confiáveis.

O processo de criopreservação pode ser realizado por dois métodos: congelação lenta e a vitrificação (congelação rápida). Segundo Sanches et al. (2013), independentemente do método utilizado, a criopreservação baseia-se em cinco etapas fundamentais: 1) exposição ao agente crioprotetor, com a finalidade de permitir a difusão desses agentes nos compartimentos celulares; 2) resfriamento com redução da temperatura de forma gradual (congelação lenta) ou rápida (vitrificação), na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica; 3) armazenamento ou estocagem, permitindo a preservação do material em temperatura ultrabaixa por períodos indefinidos; 4) descongelação ou aquecimento, etapa na qual ocorre o resgate do material criopreservados e retomada do metabolismo celular; e 5) diluição ou remoção do agente crioprotetor, para evitar a ação tóxica dos resíduos presentes.

A congelação clássica (lenta) é caracterizada por uma redução gradual da temperatura, com o objetivo de reduzir o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido (Sanches et al., 2013). Além disso, é caracterizada também por uma desidratação celular gradual que evita ou reduz a formação de cristais de gelo. Nesta situação, baixas concentrações de agentes crioprotetores são suficientes a fim de que esses objetivos sejam alcançados (Shaw, 2000). Mesmo sendo uma técnica bastante utilizada nos programas de reprodução assistida, seu uso requer altos investimentos devido a necessidade de equipamentos sofisticados (Morotó et al., 2008; Silva et al., 2021).

A vitrificação é determinado por uma redução brusca da temperatura. Nos últimos anos vem demonstrando resultados favoráveis na conservação de células com menos danos químicos, sem formação de gelo intracelular, de baixo custo, rápida e fácil de ser realizada, mas com maiores risco de efeito tóxico por conta da elevada concentração de agentes crioprotetores (Rubinsky, 2003; Pegg, 2007; Carvalho et al., 2011). Na vitrificação são utilizadas altas concentrações de crioprotetores, para aumentar a viscosidade do meio, transformando em estado amorfo como vidro ou vítreo sólido (Rubinsky, 2003; Suresh et al., 2021).

No processo de criopreservação podem ocorrer inúmeras lesões no oócito denominadas como crioinjúrias, por consequência à formação de cristais de gelo no espaço intracelular e pelo estresse osmótico (Yurchu et al., 2018). Lesões morfológicas e funcionais como a ruptura de zona pelúcida, que compromete a sobrevivência e o desenvolvimento do oócito; interrupções da comunicação por junções entre as células do *cumulus* e o oócito; alterações na conformação do citoesqueleto

por despolimerização dos microtúbulos do fuso acromático; comprometimento da integridade da membrana plasmática; redução do potencial de membrana das mitocôndrias, reduzindo a concentração de ATP intracelular; aumento dos níveis de espécies reativas (EROs), por alterações ao sistema antioxidantes. Essas crioinjúrias são definidas como as causas que justificam a baixa competência observada em oócitos criopreservados (Sanches et al., 2013; Succu et al., 2018; Guresh et al., 2021).

5. Crioprotetores

São substâncias com alta solubilidade em água, essenciais para criopreservação das células, sua toxicidade é proporcional a sua concentração e temperatura; reduz a concentração eletrolítica em meios não congelados e a quantidade de água que cristaliza (Abdelhafez, 2010; Silva et al., 2021).

São classificados em crioprotetores penetrantes (intracelulares) e crioprotetores não penetrantes (extracelulares).

Os crioprotetores penetrantes (intracelulares) são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na membrana celular e fazer ligações de hidrogênio com as moléculas da água, inibindo a formação de cristais de gelo (Rall, 1984; John, 2006; Rienze et al., 2017). Contudo, a eficiência destes agentes pode variar em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada (Yurchu et al., 2018), a concentração e tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação propriamente dito. Além disso, as diferenças estruturais entre as espécies animais é também um fator que pode influenciar na eficácia de um crioprotetor (Fuku et al., 1992). Dentre os crioprotetores intracelulares destacam-se, o etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido e o propanodiol (Yurchu et al., 2018).

Os crioprotetores não penetrantes (extracelulares) atuam fora da célula, extraindo água do espaço intracelular, fazendo com que a concentração de líquido do crioprotetor penetrante aumente o espaço intracelular evitando o choque osmótico. Os mais utilizados são os polímeros, sacarídeos e as proteínas (John, 2006; Silva et al., 2021).

Os crioprotetores mais utilizados nas técnicas de criopreservação lenta e vitrificação são o etilenoglicol (EG) e o dimetilsulfóxido (DMSO).

O etilenoglicol ou monoetilenoglicol, é um álcool de fórmula molecular $C_2H_4(OH)_2$, obtido a partir da hidrólise do óxido de eteno, empregado como anticongelante em sistemas de refrigeração de motores, fluido de freio e como matéria prima para produção de fibra poliéster, é o crioprotetor mais utilizado nos métodos de criopreservação seguido do glicerol (Martins, 2005; Abdelhafez, 2010; Silva et al., 2021). No sistema celular, a metabolização do EG ocorre inicialmente no retículo endoplasmático, onde é convertido em glicolaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH) e em menor quantidade pelo citocromo P450 2E1 (Sumner et al., 1999). O EG tem sido corriqueiramente empregado para a conservação de folículos ovarianos pré-antrais isolados ou inclusos em tecido ovariano, oócitos e embriões, obtendo-se resultados satisfatórios e promissores (Rubinsky, 2003; Alves et al., 2013; Silva et al., 2021).

O dimetilsulfóxido é um composto polar, com fórmula química C_2H_6SO (Rosenbaum, 1965). É determinado com peso molecular de 78 g/mol (Carpenter, 1994) e temperatura de congelação de 18,5 °C (Brayton, 1986). Bastante utilizado para solubilizar pequenas moléculas orgânicas (Camici et al., 2006) e foi sintetizado pela primeira vez pelo químico russo Alexander Saytzeff, sendo inicialmente empregado apenas como solvente (Moura, 2009). Por ser um subproduto da indústria de extração de celulose e, então facilmente disponível, passou a ser utilizado industrialmente a partir da década de quarenta do século vinte (Crivellente et al., 2013; Rajan & Matsumura, 2018).

O dimetilsulfóxido é álcool dipolar, capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração das moléculas e exerce interação com as membranas, atravessando-as rapidamente por meio de difusão (Soyka et al., 1999). Essa substância é considerada relativamente

atóxica (Wusteman, 2008) e é encontrada em diversas espécies vegetais e animais, incluindo o homem (Lee, 1999; Silva et al., 2021).

Tanto o dimetilsulfóxido quanto seus metabólitos têm baixo potencial tóxico (Gaylor, 2007; Aye et al., 2010). Avaliando-se a genotoxicidade dos agentes crioprotetores mais utilizados na criopreservação, foi confirmado que, dentre os agentes estudados (DMSO, EG e propanodiol), o DMSO foi o único que não provocou alterações cromossômicas, mesmo em concentrações elevadas de 150 a 200 mg/ mL e tem sido utilizado com sucesso para criopreservação de gâmetas e embriões (Kin, 2005; Wusteman, 2008; Rajan & Matsumura, 2018).

6. Estruturas e Características Morfológicas dos Oócitos

Complexo *cumulus oophorus* (CCO), é o nome dado ao conjunto, oócito e células do *cumulus*. as células do *cumulus* são células da granulosa capacitadas que envolvem o oócito (Zhang et al., 1995). Elas são ferramentas, via junções gap, responsável pela nutrição do oócito durante o crescimento e supostamente passam fatores inibidores, como adenosina monofosfato cíclica (CAMP), necessários para a manutenção da meiose (Gilchrist, 2008). Sabe-se que têm papel predominante na comunicação bidirecional com o oócito e possuem inúmeras funções, tais como a coordenação do desenvolvimento folicular, proteção e a maturação do oócito e a retirada dessas células reduz significativamente o desenvolvimento embrionário subsequente (Zhang et al., 1995; Shioya et al., 1998).

Há evidência suficiente de que fatores secretados pelas células do *cumulus* são importantes para a promoção da maturação citoplasmática do oócito (Tanghe et al., 2003) e juntamente com as condições do sistema de cultivo e composição do meio de maturação *in vitro*, exercem influências no subsequente o desenvolvimento embrionário (Hashimoto e Kishimoto, 1998; Gilchrist et al., 2008), sendo que esses parâmetros podem ser avaliados pela determinação da taxa de desenvolvimento embrionário após a fecundação do oócito, na qual ocorrem diversas mudanças, tanto estruturais quanto bioquímicas. Tais mudanças podem ser classificadas como maturação nuclear e citoplasmática (Gilchrist et al., 2008).

Zona pelúcida é uma espessa camada de matriz extracelular glicoproteica que envolve o oócito e confere aos gametas femininos uma especificidade. Sua integridade está relacionada com o desenvolvimento normal dos folículos e dos oócitos (Camargos et al., 2019). Possui importante atribuição na fertilização, viabilizando a interação do espermatozoide/oócito na reação acrossômica e impedir a polispermias. Mudanças nas camadas glicoproteicas desencadeadas pela ação de um único espermatozoide ligado a seus receptores induzem a liberação dos grânulos corticais. As enzimas liberadas dos grânulos corticais agem como ligações cruzadas de glicoproteínas da zona pelúcida, impedindo a penetração de outro espermatozoide (Bertrand, 1995). Ela também é importante no estágio de blastocisto, quando o embrião precisa sair da zona pelúcida para implantação no epitélio uterino. Nessa fase, uma zona pelúcida fica mais fina facilitando a saída do embrião e implantação com sucesso (Gabrielsen, 2000).

Corpúsculos Polares são células que se formam durante a fase de maturação da oogênese nos mamíferos, a fim de permitir a redução cromossômica característica da meiose. No período da ovulação a vesícula germinativa é exposta ao hormônio luteinizante (LH), ocorrendo a sua ruptura e extrusão do primeiro corpúsculo polar. O oócito permanece, então, no estágio de metáfase II até a fertilização quando há extrusão de segundo corpúsculo polar (Camargos et al., 2019).

Na avaliação morfológica da maturação nuclear, os oócitos imaturos se tornam aptos à fertilização após a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a metáfase II é atingida (Cognié et al., 2003).

O ooplasma, conhecido como citoplasma do oócito. Para classificar um oócito de boa qualidade ele deve possuir um ooplasma claro com granulação moderada e sem inclusões citoplasmáticas. Um oócito com o citoplasma escuro diminui 83% da probabilidade de obter um embrião de boa qualidade (Ten et al., 2007).

7. Maturações Oocitárias

O processo de maturação oocitária é definido como uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos (Fissore et al., 2002).

A maturação nuclear diz respeito à progressão da meiose a partir do estágio dictiatio (diplóteno da prófase da primeira meiose - prófase I) até a fase de metáfase II (Combelles et al., 2002).

A competência meiótica tem sido relacionada com mudanças no crescimento do oócito, organização da cromatina, estágio do ciclo celular meiótico, fosforilação da proteína reativa a fosfoproteína mitótica monoclonal-2 (MPM-2), atividade transcricional e organização dos microtúbulos citoplasmáticos em oócitos de várias espécies de mamíferos (Wickramasinghe et al., 1991; Schramm et al., 1993; Crozet et al., 1995; Fair et al., 1995; Combelles et al., 2002).

Oócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais iniciais adquirem capacidade de quebra da vesícula germinativa apenas quando atingem um determinado diâmetro de acordo com a espécie (maior que 75 µm para camundongos e maior que 110 µm para ruminantes) (Eppig e Schroeder, 1989; Fair et al., 1995; Anguita et al., 2007). A maturação nuclear de oócitos pré-ovulatórios é regulada por fatores presentes no fluido folicular, pela interação dos oócitos e células foliculares, bem como por fatores endócrinos, tais como as gonadotrofinas (Kim et al., 2008).

O controle da maturação nuclear está intrinsicamente ligado às atividades enzimáticas de proteínas quinases citoplasmáticas, fator promotor da maturação (MPF) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Ruderman et al., 1991). Oócitos incompetentes são deficientes em RNAs mensageiros que codificam para MPF. Enzimas quinases e fosfatases estão envolvidas no reinício e na completa maturação meiótica do oócito (Gonçalves et al., 2002). O aumento das atividades de ambas quinases é responsável pelo início da quebra de vesícula germinativa (QVG) e essencial para a parada do oócito na metáfase da segunda divisão meiótica (MII) (Masui & Markert, 1971; Nurse, 1990; Kalous et al., 1993; Kosako, 1994; Fissore et al., 1996), a qual é então mantida pelas atividades elevadas contínuas de ambas quinases (Masui & Markert, 1971; Hashimoto & Kishimoto, 1986; Kosako et al., 1994).

A maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito de mamíferos passa para se tornar uma célula capaz de conceber e dar suporte ao desenvolvimento embrionário. Estas transformações dizem respeito à realocação das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, a estocagem de proteínas e RNA, o desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio. Nesta reestruturação, a maioria das organelas migra para o centro da célula (Anguita et al., 2007).

Durante o crescimento e maturação do oócito, as GCs (organelas derivadas do Golgi), vesículas secretórias que circundam a membrana, aumentam em número e migram em direção ao córtex, assumindo uma posição de 0,4 - 0,6 µm abaixo da membrana plasmática, tal redistribuição é um importante critério para avaliação da maturação citoplasmática (Ducibella & Buetow, 1994; Hoodbhoy & Talbot, 1994; Damiani et al., 1996; Miyara et al., 2003). As GCs dos mamíferos contêm enzimas, incluindo proteinases, glicosidases e também material glicosilado. Após a fusão das membranas do oócito com o espermatozoide ocorre a exocitose destes e seu conteúdo é subsequentemente liberado para o espaço perivitelínico. Este processo é chamado de Reação Cortical. Acredita-se que as enzimas liberadas modificam a zona pelúcida e então previnem a polispermia (Miller et al., 1993; Hoodbhoy & Talbot, 1994).

Um oócito que não tenha completado a maturação citoplasmática é pobre em qualidade, conseqüentemente incapaz de completar o processo de desenvolvimento normal. Entretanto, os mecanismos celulares que levam a competência de desenvolvimento do oócito são totalmente nucleares (Krisher, 2004).

A Maturação *in vitro* (MIV) é influenciada pela origem e qualidade dos oócitos, pelas condições de incubação e pela composição dos meios utilizados (Cocero et al., 2011). Durante a MIV, oócitos imaturos devem completar a maturação nuclear

e a citoplasmática para posteriormente estar apto a fecundação e o desenvolvimento embrionário (Cocero et al., 2011). Os oócitos imaturo serão aptos à fertilização após alcançarem a maturação nuclear, quando há extrusão do primeiro corpúsculo polar e a metáfase II é atingida (Cognié et al., 2003) e a citoplasmática, por meio de alterações estruturais e moleculares e da redistribuição de organelas (Cocero et al., 2011; Amiridis & Cseh, 2012). A MIV de oócitos ovinos e caprinos está bem estabelecida em temperatura de 38-39°C por 22-27 h, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ (Amiridis & Cseh, 2012; Monreal et al., 2013) e o meio mais utilizado é o TCM-199 (*Tissue Culture Medium - 199*), suplementado com piruvato, bicarbonato, FSH, LH, estradiol (E₂) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cocero et al., 2011).

8. Partenogênese e Ativação Partenogenéticas

O termo parthenogenesis, do grego “nascimento virgem” é um evento reprodutivo onde há produção de descendentes por uma fêmea sem a contribuição do macho e sem a redução meiótica dos cromossomos. É um procedimento comum entre os insetos, principalmente nas abelhas, mosquitos e formigas. Também podem decorrer em alguns vertebrados, como as cobras, pássaros e anfíbios. Em mamíferos, só é possível verificá-la em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, por meio de alguns estímulos *in vitro* no oócito de ratas, cabras, vacas, macacas e humanas (Hipp & Atala, 2004; Kharche & Birade, 2013).

A ativação partenogenética de oócitos de mamíferos fornece recurso de estudo que permite investigar separadamente o papel do genoma paterno e materno no controle do início do desenvolvimento embrionário, contribui para o melhor entendimento do mecanismo de fertilização, e permite compreender os princípios gerais do sistema de sinalização da célula (Susko-Parrish et al., 1994; Lan et al., 2005; Malik et al. 2014).

A partenogênese pode ser um método alternativo viável de produzir a fêmeas idênticas e, portanto, a multiplicação mais rápida de algumas fêmeas superiores pode ser alcançada. Procedimento *in vitro* eficiente para maturação oocitária e desenvolvimento partenogenético em pequenos ruminantes é importante para o desenvolvimento de novas biotecnologias, como transferência gênica, expressão gênica por meio de diferentes modos de desenvolvimento partenogenético, ou seja, multiplicação haplóide ou diplóide, bem como embriões idênticos (Juhi, 2013).

A ativação partenogenética pode ser realizada em oócitos em metáfase II, resultando na extrusão do segundo corpúsculo polar e levando à formação de um partenoto haplóide. Este método é raramente utilizado, pois, neste caso, a competência de desenvolvimento é reduzida em comparação aos embriões normais e aos partenotos diploides (Henery, 1992).

Os partenotos diplóides são facilmente obtidos: podem ser derivados de oócitos em metáfase II cuja cromátides irmãs do cromossomo segregam sem serem extrusadas o segundo corpúsculo polar: assim o oócito retém seu status diplóide, seja homozigoto ou heterozigoto associados ao cruzamento em pronúcleos únicos. Partenotos diplóides podem ser obtidos de duas maneiras diferentes. O mais comum consiste em combinar a ativação de oócitos em metáfase II com a exposição a um inibidor da extrusão do segundo corpúsculo polar, sem afetar a formação e o movimento dos pronúcleos (Balakier, 1976).

Vários métodos foram desenvolvidos para a indução da ativação partenogenética, incluindo ionóforo de cálcio (Funahashi et al., 1994), etanol (Kharche et al., 2013), A-23187, ionóforo de cálcio e ciclohexamida isoladamente (Nussbaum et al., 1995) ou em combinação com um inibidor da fosforilação da proteína, (DMAP) (Liu & Yang, 1999), um choque elétrico (Kim et al., 1996), ciclohexamida (Nussbaum & Prather, 1995) ionomicina (Loi et al., 1998), ultrassom (Sato et al., 2005), e campo magnético (Max et al., 2007). No método tradicional de produção de embriões de caprinos clonados, pulsos elétricos foram aplicados para ativação de oócitos reconstruídos (Shen et al., 2006).

Em cada método, uma resposta inicial no oócito maduro em metáfase II é um aumento incremental no Ca²⁺ intracelular, semelhante à produzida após a ativação pelo espermatozoide penetrante durante o processo de

fertilização. Então, o oócito artificialmente ativado responde ainda, iniciando a reação cortical e retomando a meiose, seguida pela segunda extrusão do corpúsculo polar (Juhi, 2013).

A ionomicina associada sequencialmente com 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) é o método mais utilizado para se obter a ativação de oócitos e é considerado semelhante a ativação de oócitos com espermatozoides na fertilização *in vitro* (FIV) quanto ao desenvolvimento de blastocistos (Susko-Parish et al., 1994; Rho et al., 1998; Ongeri et al., 2001). Permite o aumento intracelular de Ca^{2+} pela liberação de cálcio das reservas citoplasmáticas (ionomicina), similar ao fenômeno observado após a penetração dos espermatozoides no oócito, enquanto a proteína 6-DMAP acelera a formação pronuclear e o desenvolvimento partenogênese de oócitos em metáfase II de camundongos e bovinos por inibir as funções da proteína quinase e promover a mitose (Szollosi et al., 1993; Susko-Parish et al., 1994). O 6-DMAP também pode melhorar a inativação do fator promotor de maturação (MPF) e proteína quinase ativada por mitogéno (MAPK). Ambos se aumentarem, iniciará a quebra da vesícula germinal e a progressão da metáfase durante a maturação oocitária. Após a FIV ou a ativação partenogenética, a MPF é inativada em oócitos que estão na fase de transição da M II e, a atividade da MAPK diminui quando inicia a formação pró-nuclear (Liu et al., 1998).

Assim, a sequência de eventos que ocorrem durante a ativação partenogenética imita a cascata de atividades intracelulares produzidas pelos espermatozoides penetrantes (Juhi, 2013).

9. Cultivo *in vitro* (CIV) de Embriões

A última etapa do processo de produção *in vitro* de embriões é o cultivo. Para o sucesso dessa etapa são necessários grandes eventos como: início das segmentações ou clivagens; ativação do genoma embrionário e compactação da mórula até a fase de blastocisto (Freitas et al., 2017). Embora tenham ocorrido avanços na etapa de CIV nos últimos anos, está ainda é considerada uma etapa limitante para o emprego da biotecnologia de PIV de embriões caprinos. Todavia, mesmo com uma redução de 15-20% da viabilidade embrionária, quando se compara o CIV ao cultivo *in vivo* de embriões, ainda é possível a obtenção de um grande número de embriões de uma mesma doadora. A duração do cultivo é de sete dias (Bernardi, 2005; Monreal et al., 2013).

O meio de CIV mais comumente utilizado é composto por SOF (Synthetic Oviductal Fluid), suplementado com aminoácidos, albumina sérica bovina (BSA), meio semidefinido e/ou Soro fetal bovino (SFB), meio indefinido. Bernardi, (2005) e Cognié et al. (2004) relataram maior viabilidade após a transferência de embriões ovinos em meio suplementado a partir dos dias, dois e três do CIV com SFB. Quanto à atmosfera gasosa, a baixa tensão de oxigênio (5-7% O_2) vem sendo preferencialmente utilizada por resultar em maior produção de blastocistos comparada à utilização de elevada tensão de oxigênio (20% O_2) (Yuan et al., 2003).

A etapa de CIV é considerada um dos entraves para o sucesso do sistema de PIV de embriões caprinos. Ainda há um extenso campo de estudo quanto ao desenvolvimento e à padronização de meios de cultivo, como, por exemplo, a suplementação com fatores de crescimento e antioxidantes, a substituição ao uso do SFB, a fim de aperfeiçoar o sistema de cultivo para que haja um aumento do desenvolvimento e da qualidade dos embriões obtidos (Rocha-Frigoni et al., 2014).

10. Avaliação da Viabilidade após a Maturação Oocitária e Desenvolvimento Embrionário

A qualidade do oócito também tem um grande impacto na sobrevivência do embrião inicial, no estabelecimento e manutenção da gestação, no desenvolvimento fetal e até nas doenças na fase adulta (Krisher, 2004). A morfologia e o grau de expansão das células do *cumulus* são métodos clássicos para avaliação da maturação oocitária, pois tem sua importância na comunicação bidirecional existente entre as células do *cumulus* e o oócitos, por meio das junções intercomunicantes (junções

do tipo *gap*), pois auxiliam na passagem de componentes químicos reguladores da maturação oocitária e proliferação das células do *cumulus*, passagem de nutrientes, íons, nucleotídeos e substâncias de baixo peso molecular (Crocomo et al., 2012; Chaves et al., 2010). O estágio nuclear dos oócitos após a MIV pode ser examinado sob microscopia ótica com contraste de fase, após fixação dos oócitos com metanol-ácido acético e coloração com 1% de lacmóide em 45% de solução de ácido acético (Hunter e Polge, 1966) ou com 1% de orceína em 40% de solução de ácido acético (Li et al., 2002). Outra técnica para visualização dos cromossomos dos oócitos, bem como a determinação dos estádios nucleares de maturação é a microscopia por fluorescência (Miyara et al., 2003).

O corante Hoechst 33342 é também muito utilizado em oócitos submetidos a MIV, que em seguida são desnudados para avaliação da viabilidade após a maturação e pós-cultivo embrionário por meio de microscópio invertido com fluorescência (Grondahl et al., 1995).

Muitas técnicas para avaliação da viabilidade após maturação e desenvolvimento embrionário são realizadas e outras estão em fases de testes, mas infelizmente, somente métodos invasivos que causam a destruição das estruturas são capazes de prever com relativa precisão a qualidade deles (Chaves et al. 2010). Entretanto, recentemente tem sido utilizado o corante Azul Cresil Brilhante, um método não invasivo, para tal finalidade. Esta substância é capaz de determinar a atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G₆PDH) presente em oócitos durante o crescimento e mesmo realizada a coloração, após lavagens para retirada do corante as células continuam viáveis (Rodríguez González et al., 2003).

A maturação citoplasmática pode ser avaliada pela distribuição das organelas por microscopia eletrônica (Fernandes et al., 2006), migração dos grânulos corticais (Curcio et al., 2014), clivagem partenogenética (Carneiro et al., 2001) ou técnicas de fecundação (Carnevale, 1996). Portanto em meio a grandes quantidades de informações disponíveis sobre o assunto, não se chegou ainda a um método ideal para avaliação da maturação citoplasmática que não seja a própria fecundação e o posterior desenvolvimento normal do embrião e do feto (Krisher, 2004).

11. Considerações Finais

A produção *in vitro* caprina sem dúvidas possui um grande potencial para a propagação do material biológico de fêmeas de elevado valor genético. Contudo, observa-se nos estudos realizados grandes variações nas taxas de sucesso, indicando que melhores resultados ainda devem ser alcançados.

A ativação partenogenética de oócitos de mamíferos contribui para o melhor entendimento do mecanismo de fertilização, e permite compreender os princípios gerais do sistema de sinalização da célula, pode ser um método alternativo viável de produzir a fêmeas idênticas e superiores pode ser alcançada.

Pesquisas na área de proteômica poderão contribuir para o sucesso de programas de PIV em caprinos e, em particular, na preservação de raças ameaçadas de extinção. Além disso, o melhor conhecimento sobre as interações oócito-oviduto podem também fornecer informações cruciais para o desenvolvimento de novos meios de cultivo dos embriões.

Recomenda-se que sejam feitas novas pesquisas que abordem a temática pesquisada, com finalidade de contribuir com as pesquisas e produção de informações científicas na área das biotecnologias reprodutivas.

Referências

- Anguita, B., Jimenez-Macedo, A. R., Izquierdo, D., Mogas, T. & Paramio, M. T. (2007). Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. *Theriogenology*, 67, 526-536.
- Amiridis, G. S. C. S. E. H. S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 152-161.
- Aye, M., Giorgio, C. D. I., Mo, M. D. E., Botta, A., Perrin, J. & Courbiere, B. (2010). Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide. Ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1905-1912.

- Balakier, H. & Tarkowski, A. K. (1976). Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and cytochalasin B. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 35, 25–39.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C.L., Lazaris, A. & Karatzas, C. N. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, 57, 275-284.
- Baldassarre, H., Koeman, J., Keefer, C. L. & Downey, B. (2003). Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning Stem Cells*, Philadelphia, 5, 279-285.
- Baldassarre, H. & Karatzas, C. N. (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, Dublin, 82, 255-266.
- Baldassarre, H. (2012) Practical aspects for implementing *in vitro* embryo production and cloning programs in sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, Dublin, 9, 188-194.
- Baldassarre, H., Menchaca, A., Anegón, I., Whitelaw, B. & Crispo, M. (2016). New insights and current tools for genetically engineered (EG) sheep and goats. *Theriogenology*, 86, 160-169.
- Brayton, C. F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Veterinarian*, 76, 76-90.
- Camargos, M. G. R. S., Rodrigues, J. K., Lobach, V. N., Cury-silva, T. E., Nunes, M. G., Camargos, A. F. & Reis, F. M. (2019) Human oocyte morphometry before and after cryopreservation: a prospective cohort study. *Cryobiology*, 88, 81-86.
- Camici, G. G., Steffel, J., Akhmedov, A., Schafer, N., Balding, R. J., Schulz, U., Shojaati, K., Matter, C. M., Yang, Z., Lüscher T. F. & Tanner, F. C. (2006) Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. *Circulation*, 114, 1512-1521.
- Carneiro, G., Lorenzo, P., Pimentel, C., Pegoraro, L., Bertolini, M., Ball, B., Anderson, G. & Liu, I. (2001) Influence of insulin-like growth factor-I and interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biology of Reproduction*, 65, 899-905.
- Carvalho, J. M., Maia, G. A., Sousa, P. H. M. & Júnior, G. A. M. (2006) Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. *Ciências Agrárias*, 27, 437-452.
- Carpenter, R. J., Angel, M. F. & Morgan, R. F. (1994). Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, 110, 228-231.
- Carnevale, E. M. (1996). Gamete intrafallopian transfer. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, 12, 47-60.
- Chaves, R. N., Duarte, A. B. G., Matos, M. H. T. & Figueiredo, J. R. (2010). Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 34, 37-49.
- Cocero, M. J., Alabart, J. L., Hammami, S., Martí, J. I., Lahoz, B., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J. F. & Folch, J. (2011). The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reproduction Domestic Animal*, 46, 463-470.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N. & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59, 171-188.
- Cognie, Y., Poulin, N., Locatelli, Y. & Mermillod P. (2004). State-of-the-art production, conservation and transfer of *in vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reproduction Fertility and Development*, 16, 437-445.
- Crivellenti, L. Z., Crivellenti, S. B. & Carvalho, M. B. (2013). Toxicidade do dimetilsulfóxido em cães hípidos e doentes renais crônicos. *Ciencia Rural*, 43, 1831-1837.
- Crozet, N., Ahmed, A. & Dubos, M. P. (1995) Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Journal of Reproduction Fertility*, 105, 293-298.
- Curcio, B. R., Gastal, M. O., Pereira, G. R., Corcini, C. D., Landim-Alvarenga, F. C., Barros, S. S., Nogueira, C. E. W., Deschamps, J. C. & Gastal E. L. (2014). Ultrastructural Morphology and Nuclear Maturation Rates of Immature Equine Oocytes Vitrified with Different Solutions and Exposure Times. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34, 632-640.
- Damasceno, T. C. M. *Qualidade de oócitos ovinos após criopreservação em meio alternativo contendo ACP-408®*. 2017. 52f. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- Damiani, P., Fissore, R. A., Cibelli, J. B., Long, C. R., Balise, J. J., Robl, J. M. & DUBY, R.T. (1996). Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 45, 521–534.
- Ducibella, T. & Buetow, J. (1994). Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. *Developmental Biology*, 165, 95–104.
- Estrela, C. (2018). Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa. Editora Artes Médicas.
- Fair, T., Hyttel, P. & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, 42, 437–442.
- Fernandes, C. B., Peres, K. R., Alvarenga, M. A. & Landim- Alvarenga, F. C. (2006). The Use of Transmission Electron Microscopy and Oocyte Transfer to Evaluate *In Vitro* Maturation of Equine Oocytes in Different Culture Conditions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26, 159-167.

- Fissore, R. A., Kurokawa M., Knott, J., Zhang M. & Smyth J. (2002). Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*, 124, 745-754.
- Freitas, V. J. F., Andrade M. L. L., Cajazeiras, J. B. & Luz, J. V. (2007). Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35, 781-786.
- Freitas, V. J. F. (2013). Criopreservação de oócitos e embriões. In: Oliveira, M. E. F., Teixeira P. P. M. & Vicente, W. R. R. (Eds.). Biotécnicas Reprodutivas Em Ovinos e Caprinos, 1. ed., São Paulo, SP. *MedVet*, p. 201.
- Fuku, E., Kojima, T., Shioya, Y., Marcus, G. J. & Downey, B. R. (1992). In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29, 485-492.
- Funahashi, H., Cantley T., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Rieke, A. & Day, B. N. (1994). In vitro development of in vitro matured pig oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, 50, 1072-1077.
- Gaylor Chemical Company. (2007). Dimethyl sulfoxide (DMSO) health and safety information. *Slidell Bulletin*, 106, 16.
- Gabrielsen, A., Bhatnager, P. R., Petersen, K. & Lindenberg, S. (2000). Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17, 323-328.
- Gilchrist, B., Lane, M., Thompson, J. G. (2017). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, 14, 159-177.
- Gonçalves, P. B. D., Figueiredo, J. R. & Freitas, V. J. F. (2008.) *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal*. (2a ed.), Roca.
- Graff, K. J., Meintjes, M., Dyer, V. W., Paul, J. B., Denniston, R. S., Ziomek, C. & Godke, R. A. (1999) Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology*, 51, 1099-1119.
- Grondahl, C., Host, T., Brück, I., Viuff, D., Bezard, J., Fair, T., Greve, T. & Hyttel, P. (1995). In vitro production of equine embryos. *Biology of Reproduction*, 1, 299-307.
- Hashimoto, N. & Kishimoto, T. (1986). Cell cycle dynamics of maturation promoting factor during mouse oocyte maturation. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 11, 471-477.
- Henery, C. C. & Kaufman, M. H. (1992). Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Molecular Reproduction and Development*, 31, 258-263.
- Hipp, J. A. & Atala, A. (2004). A tissue engineering, stem cells, cloning, and partenogenesis, new paradigms of therapy. *Journal Experimental e Clinical Assisted Reproduction*, 1, 3.
- Hunter, R. H. F. & Polge, C. (1966). Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *Journal Reproduction and Fertility*, 12, 525-531.
- Juhi, P. S. D., Kharche, A. K., Goel, S. K. & Jindal, S. (2013). Comparative study on parthenogenetic activation and embryo production from in vitro matured caprine oocytes. *Small Ruminant Research*, 113, 136-140.
- Kalous, J., Kubelka, M., Rimkeviciova, Z., Guerrier, P. & Motlik, J. (1993). Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcomes cycloheximide- and 6- dimethylaminopurine block in cattle and pig oocytes. *Developmental Biology*, 157, 448-454.
- Kharche, A. K., Goel, S. K., Jindal, S., Jha, B. K. & Goel, P. (2013). Assessment of parthenogenetic embryo production by activation of in vitro matured caprine oocytes with different concentrations of ethanol. *Small Ruminant Research*, 111, 100-103.
- Kim, N. H., Simerly, C., Funahashi, H., Schatten, G. & Day, B. N. (1996). Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. *Biology of Reproduction*, 54, 1397-1404.
- Kim S. S., Kang, H. G., Kim, N. H., Lee, H. C. & Lee, H. H. (2008). Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved ovarian tissue after xenotransplantation. *Human Reproduction*, 20, 2502-2508.
- Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82, 14-23.
- Lee, P. A., Mora, S. J. & Lévassieur, M. A. (1999). Review of dimethylsulfoxide in aquatic environments. *Atmosphere-ocean*, 37, 439-456.
- Li, P., Ledda, S., Fulka, J. J., Cappai, P. & Moor, R. M. (1998) Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos, effect of activation protocols. *Biology of Reproduction*, 58, 1177-1187.
- Martins, L. & Cardoso, D. (2005). Produção de etilenoglicóis e derivados por reações catalíticas de óxido de eteno. *Química Nova*, 28, 264-273.
- Masui, Y. & Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 177, 129-145.
- Miller, D. J., Gong, X. & Decker, G. (1993). Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *The Journal of Cell Biology*, 123, 1431-1440.
- Miyara, F., Mign, E. C., Dumont-Hassan, M., Le M. A., Cohen-Bacrie, P., Aubriot, F. X., Glissant, A., Nathan, C., Douard, S., Stanovici, A. & Debey, P. (2003). Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 64, 458-470.

- Moura, J. G. P. (2009). Nutrientes e terapêutica, como usá-los quando usá-lo como avalia suas carências radicais livres na saúde. (2a ed.), *Visão artes*, p. 340.
- Nunes, J. F. (2010). *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes*. Tecnograf.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating the onset of Mphase. *Nature*, 344, 503–508.
- Nussbaum, D. J. & Prather, R. S. (1995). Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Molecular Reproduction and Development*, 195, 70–75.
- Paula, N. R. O., Cardoso, J. F. S., Oliveira, M. A.L. & Freitas V. J. F. (2008). Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro: técnicas, problemas e perspectivas. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 32, 21-35.
- Paramio, M. T. & Izquierdo, D. (2014). Assisted reproduction technologies in goats. *Small Ruminant Research*, 121, 21–26.
- Paramio, M. T. & IZquierdo, D. (2016). Recentes avanços na produção in vitro de embriões em pequenos ruminantes. *Theriogenology*, 86, 152-159.
- Pegg, D. E. (2007). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. *Molecular Biology*, 2, 348.
- Rajan, R. & Matsumura, K. (2018). Development and Application of Cryoprotectants. *Adv Exp Med Biol.*, 1081, 339-354.
- Rienze, L., Gracia, C., Maggiulli, R., Labarbera, A. R., Kaser, D. J., Ubaldi, F. M., Vanderpoel, S. & Racowsky, C. (2017). Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update*, 23, 139-155.
- Rocha-Frigoni, N. A. R., Leão, B. C. S., Feliciano, M. A. R., Vicente, W. R. R. & Oliveira, M. E. F. (2014). Produção in vitro de embriões: avanços e desafios. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38, 103-109.
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Izquierdo, D. & Paramio, M. T. (2003). Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reproduction Nutrition Development*, 43, 179-187.
- Rubinsky, B. (2003). Principles of low temperature cell preservation. *Heart Failure Reviews*, 8, 277-284.
- Ruderman, J., Luca, F., Shibuya, E., Gavin, K., Boulton, T. & Cobb, M. (1991). Control of the cell cycle in early embryos. *Cold spring harbor symposia on quantitative biology*, 56, 495–502.
- Sanches, B. V., Marinho, L. S. R., Filho, B. D. O., Pontes, J. H. F., Basso, A. C., Meirinhos, M. L. G., Silva-Santos, K. C., Ferreira, C. R. & Seneda, S. (2013). Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, 80, 372-377.
- Samake, S., Amoah, E. A., Mobini, S., Gazal, O. & Gelaye, S. (2000). In vitro fertilization of goat oocytes during the nonbreeding season. *Small Ruminant Research*, 35, 49–54.
- Shen, P. C., Lee, S. N., Wu, J. S., Huang, J. C., Chu, F. H., Chang, C. C., Kung, J. C., Lin, H. H., Chen, L. R., Shiau, J. W., Yen, N. T. & Cheng, W. T. K. (2006). The effect of electrical field strength on activation and development of cloned caprine embryos. *Animal Reproduction Science*, 92, 310–320.
- Shioya, Y., Kuwayama, M. & Fukushima, M. (1998). In vitro fertilization and cleavage capability of follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*, 30, 489-489.
- Silva, J. C. F., Silva, R. L. O., Vieira, J. I. T., Silva, J. B., Tavares, L. S., Silva, F. A. C., Pena, E. P. N., Chaves, M. S., Moura, M. T., Calsa-Junior, T., Benco-Iseppon, A. M., Freitas, V. J. F. & Oliveira, M. A. L. (2021). Evaluation of quality and gene expression of goat embryos produced in vivo and in vitro after cryopreservation. *Cryobiology*, 101, 115-124.
- Silva, A. E., Cavalcante, L. F., Rodrigues, B. A. & Rodrigues, J. L. (2010). The influence of powdered coconut water (ACP-318®) in in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 1042-1046.
- Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C. & Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77, 1722-1726.
- Slavik, T., Fulka, J. & Gall, I. (1992). Pregnancy rate after the transfer of sheep embryos originated from randomly chosen oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 38, 749-756.
- Sojka, J. E., Brisson-Kimmick, S. V., Carlson, G. P. & Coppoc, G. L. (1990). Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. *Proceedings... of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners*, 36, 683-690.
- Stringfellow, D. A. & Givevens, M. D. (2010). Manual of the International Embryo Transfer Society, *International Embryo Transfer Society*. 200.
- Succu, S., Gadau, S. D., Serra, E., Zinellu, A., Carru, C., Porcu, C., Naitana, S., Berlinguer, F. & Leoni, G. G. (2018). A recovery time after warming restores mitochondrial function and improves developmental competence of vitrified ovine oocytes. *Theriogenology*, 110, 18-26.
- Sumner, S. C. J., Fennell, T. R., Moore, T.A., Chanas, B., Gonzalez, F. & Ghanayem, B. I. (1999). Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical Research Toxicology*, 12, 1110-1116.
- Suresh, A., Shukla, M. K., Kumar, D., Shrivastava, O. P. & Verma, J. (2021). Simulated physiological oocyte maturation (spom) improves developmental competence of in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, 172, 193-199.

Ten, J., Mendiola, J., Vioque, J., De Juan, J. & Bernabeu, R. (2007). Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reproductive Biomedicine Online*, 14, 40-48.

Tanghe, S., Soom, A. V. & Mehrzad, J. (2003). Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*, 60, 135-149.

Vajta, G., Kuwayama, M. & Vanderzwalmen, P. (1991). Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental Biology*, 143, 162-172.

Wusteman, M., Rauen, U., Simmonds, J., Hunds, N. & Pegg, D. E. (2008). Reduction of cryoprotectant toxicity in cell in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. *Cryobiology*, 56, 72-79.

Yuan, Y. O., Van, S. O. O. M. A., Coopman, F. O., Mintiens, K., Boerjan, M. L., Van Zeveren A., De Kruijff, A. & Peelman, L. J. (2003). Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, 59, 1585-1596.

Yurchuk, T., Petrushko, M. & Fuller, B. (2018). Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars. *Early Human Development*, 126, 6-9.