



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Julianne Silva de Lima

Ativação partenogenética de oócitos maturados *in vitro* de
Cebus apella

Belém

2011

Julianne Silva de Lima

Ativação partenogenética de oócitos maturados *in vitro* de
Cebus apella

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Produção Animal.
Orientadora: Profa. Dra. Sheyla Farhaydes Souza Domingues.
Co-orientador: Prof. Dr. Moisés dos Santos Miranda

Belém

2011

Julianne Silva de Lima

Ativação partenogenética de oócitos maturados *in vitro* de
Cebus apella

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação: Belém - Pa ___/___/___

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a Sheyla Farhaydes Souza Domingues
Faculdade de Medicina Veterinária - UFPA
Orientadora e Presidente

Prof^a Dr^a Maria Clara Caldas-Bussiere
Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuária - UENF
Membro titular

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA
Membro titular

Dedico este trabalho a minha amada
mãe Irene.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo presente da vida, pelas oportunidades e vitórias obtidas. Sem a Tua companhia não teria forças para superar os momentos difíceis e chegar até aqui. Agradeço por ser Aquele que me fez e faz acreditar que tudo o que acontece na vida tem uma explicação e um propósito, e que tudo o que o Senhor me proporciona é o melhor para mim, mesmo que isso não fique claro por muitas vezes.

À minha família, em especial minha mãe que sempre foi o meu exemplo de perseverança, honestidade e amor ao próximo. Obrigada por sempre acreditar na minha carreira profissional. Aos meus irmãos Carlos e Márcia, que de alguma forma me apoiaram nos momentos em que precisei.

À minha orientadora Dra. Sheyla Domingues, que me deu a oportunidade de continuar na sua equipe de trabalho, acreditando no meu potencial científico para execução desse experimento. O meu grande estímulo foi a sua empolgação e força de vontade, não desistindo com as dificuldades encontradas ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador Dr. Moysés Miranda pela disponibilidade e boa vontade de ensinar. Agradeço pela sua paciência, humildade e exemplo como profissional.

A minha “orientanda” e futura médica veterinária Danuza Leão, pela participação no experimento, ajuda e aprendizado na minha primeira orientação de iniciação científica. Obrigada pela amizade e por compartilhar momentos difíceis do experimento, sendo sempre organizada em anotar os dados do nosso trabalho.

Ao biólogo Rafael Vilar, pela disposição e paciência em ensinar as técnicas da ativação partenogenética e diluições dos meios utilizados. Obrigada também pela amizade e companheirismo desde a graduação.

Ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM), por conceder equipamentos e a todos os seus integrantes e ex-integrantes: Nilda, Adriel, Stefânia, Dani, Luana, Carol Neves, Débora, Karol, Valéria, Gustavo e Danniell, que me ajudaram a executar esse trabalho.

A toda equipe do Centro nacional de Primatas (CENP), por disponibilizar infraestrutura adequada, conceder material de consumo, espaço e apoio para execução desse experimento. Agradeço em especial aos tratadores Obadias, Léo, Max, Rosivaldo e Seu João; à veterinária Aline, Seu Miguel, Seu Paulo X, Dona Rosa e ao Giva, pela paciência e disposição em ajudar na clínica; ao Seu Osvaldo, Alessandra, Seu Alfredo, Bosco e Sarah, pelo ajuda no laboratório; ao Dr. Muniz pela agilidade em resolver os

problemas; ao Dr. Paulo Castro e Gilmara pelo apoio no manejo; ao Reginaldo, pela fotocópias tiradas; e a Dona Laura, pelo apoio dado sempre que foi preciso.

Ao Laboratório de Fecundação *in vitro* (LabFiv) da UFPA, por conceder espaço e material necessário e pela confiança em fazer parte da equipe. Ao Prof. Ohashi pela permissão em executar meu experimento no laboratório e pelos ensinamentos científicos. Aos integrantes do LabFiv: Nath, Thiago, André, Davi, Priscilinha, Bruno, Danutinha, Marcela, Chamusca e Profa Simone, pela compreensão e paciência em dividir o espaço e os materiais de consumo, pelo agradável convívio nesses anos e principalmente pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela infraestrutura, equipe de professores e de funcionários, principalmente o secretário Rodrigo Virgolino pela sua paciência e ajuda sempre que foi necessária.

Aos meus amigos: Aline Seabra, Louise Maués, Anne Lima, Luiza Araújo, Diana Abdon, Abílio Ohana, Fábio Sousa e Mirna Yuri, que sempre torceram por mim, confiando e acreditando no meu potencial científico e acima de tudo por serem meus grandes e insubstituíveis amigos.

Aos meus amigos que conheci no mestrado e que me proporcionaram momentos inesquecíveis de descontração e até de desespero. Agradeço em especial ao amigo Alex Jr., por ser sempre leal, honesto e cúmplice. Às amigas Silvia Pedroso e Kelly Conor, pela sinceridade e compreensão, por compartilhar momentos difíceis, me ajudando sempre que foi necessário. Agradeço aos amigos Henry Manrique, Josy Sena e Willian Souza, que conviveram comigo nesses dois anos.

Aos animais deste experimento, que mesmo sem saber estão ajudando nas pesquisas científicas.

A todos aqueles que não citei, mas que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

Minha eterna gratidão a todos vocês!

“Do mesmo modo que
o metal enferruja com a ociosidade
e a água parada perde sua pureza,
assim a inércia esgota o vigor da mente.”

Leonardo da Vinci.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a maturação oocitária *in vitro* (MIV) na espécie *C. apella*, relacionando com a expansão das células do *cumulus* e promovendo a produção *in vitro* de embriões (PIVE), por meio da ativação partenogenética e fecundação *in vitro* (FIV). Os oócitos puncionados dos folículos antrais medindo 2-9 mm de diâmetro foram classificados em desnudos (OD), com poucas células do *cumulus* (PCC) e complexo *cumulus-oophorus* intacto (CCO intacto). A expansão das células do *cumulus* foi analisada nos tempos de 0, 36 e 40 h de MIV e classificada em cinco categorias de expansão. A competência meiótica nos oócitos foi verificada pela extrusão do 1º corpúsculo polar (CP) após 40 h de MIV. Os oócitos foram divididos em 3 grupos para PIVE: grupo controle (FIV), ativação partenogenética utilizando 5 µM de ionomicina em associação com 2 mM de 6-DMAP ou em associação com 50 µM de roscovitina. Para a FIV, os espermatozóides obtidos do coágulo seminal, foram diluídos em água de coco em pó (ACP-118®) e submetidos ao resfriamento para serem levados posteriormente ao cultivo *in vitro* com os oócitos. O aumento no tempo da MIV e a presença de várias células do *cumulus* associadas aos oócitos proporcionaram maior expansão das células do *cumulus*, pois somente os CCO intactos alcançaram a expansão total em 40 h de MIV ($p < 0,005$). A presença das células do *cumulus* nos oócitos (PCC e CCO intactos) maturados *in vitro* por 40 h promoveu a competência meiótica (metáfase II) significativamente mais elevada que os OD ($p < 0,005$). Após 6 h de resfriamento em ACP-118® e separação pelo método do swin-up, os espermatozóides utilizados na FIV possuíam 80% de motilidade e vigor 4. O tratamento com ionomicina/roscovitina promoveu a extrusão do 2º CP e formação pronuclear e com ionomicina/6-DMAP formou pronúcleos, sem extrusão do 2º CP. O protocolo utilizando a ionomicina/6-DMAP e da FIV originou as primeiras divisões embrionárias, observada pela taxa de clivagem. Os resultados encontrados sugerem que em *C. apella* a presença e a expansão total das células do *cumulus* estão relacionadas com a competência oocitária. A utilização dos oócitos maturados *in vitro* e dos espermatozóides diluídos e resfriados em ACP-118® promoveu a PIVE por diferentes métodos nesta espécie.

Palavras-chave: *C. apella*. Expansão das células do *cumulus*. MIV. Ativação partenogenética. FIV.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* maturation (IVM) of oocytes in *C. apella*, reporting with *cumulus* expansion and promoting *in vitro* embryo development, by means of the parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization (IVF). Oocytes were recovered by antral follicles aspiration measuring 2-9 mm of diameter and had been classified in denuded oocyte (DO), poor *cumulus* cells (PCC) and intact *cumulus-oophorus* complex (intact COC). At the 0, 36 and 40 h of IVM culture, the degree of *cumulus* expansion was assessed and classified into five categories. Development competence oocytes were verified which includes abstriction of the first polar body after 40 h IVM. Oocytes were divided in three groups: control group (IVF); parthenogenetic activation using 5 μ M of ionomycin in association with 2 mM of 6-DMAP; or with 50 μ M of roscovitine. Seminal coagulum was liquefied in coconut water solution (ACP-118[®]) and submitted to the cooling to be taken later IVF culture. The increase in the time of the IVM and the presence of some *cumulus* cells associates with oocytes had provided greater *cumulus* expansion, therefore the intact COC had only reached the total expansion in 40 h after IVM ($p < 0.005$). The presence of the *cumulus* cells in the *in vitro* matured oocytes (intact COC and PCC) for 40 h promoted meiotic competence more than DO ($p < 0.005$). After 6 h of cooling in ACP-118[®] and separation for SWIN-UP method, the spermatozoa used in the IVF obtained 80% motility and vigor 4. Exposure of oocytes to ionomycin/roscovitine induced the resumption of meiosis with extruded the second polar body and formed pronuclei. In contrast, oocytes activated with ionomycin/6-DMAP induced pronuclear formation without extrude a second polar body. IVF and ionomycin/6-DMAP treatments produced embryos that reached the cleavage stage. Our results suggest that the presence and the full *cumulus* expansion are correlate with the acquisition of meiotic and development competence in *C. apella*. Oocytes matured *in vitro* and the spermatozoa diluted and cooled in ACP-118[®] produced embryos in this specie.

Key-words: *C. apella*. *Cumulus* expansion. IVM. Parthenogenetic activation. IVF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1:** Biotécnicas da reprodução visando a PIVE em algumas espécie de primatas. **20**
- Figura 1:** Representante da espécie *Cebus apella*. Acessado em 24 de janeiro de 2011. **21**
(Fonte:http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Macaco-prego_Manduri_151207_15.JPG).
- Figura 2:** a) Ejaculação na espécie *C. apella*; b) coágulo seminal obtido após eletroejaculação. Fonte: Domingues, S.F.S. **22**
- Figura 3:** Laparotomia realizada em *C. apella* para obtenção de oócitos por punção folicular. Fonte: Domingues, S.F.S. **23**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
6-DMAP	6-dimetilaminopurina
ACP	Água de coco em pó
AI	Anáfase I
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
APC	Complexo promotor de anáfase (<i>Anaphase promoting component</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumine</i>)
Ca ⁺²	Cálcio
CDK	Ciclina dependente de quinase (<i>Cyclin dependent kinase</i>)
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
cm	Centímetros
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Gás Carbônico
CCO	<i>Complexo-cumulus-oophorus</i>
CCO intacto	CCO apresentando várias camadas de células do <i>cumulus</i>
CP	Corpúsculo polar
CSF	Fator citotástico (<i>Cytostatic factor</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento (<i>epidermal growth fator</i>)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
h	Hora
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides (<i>Intracitoplasmatic sperm injection</i>)
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato

LH	Hormônio Luteinizante
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MAPKK	MAP quinase quinase
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIII	Metáfase III
Min	Minutos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
MPF	Fator promotor da fase M (<i>M phase promoting factor</i>)
PCC	CCO com poucas células do <i>cumulus</i>
PBS	Phosphate Buffer Saline
PI	Prófase I
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PMSG	Gonadotrofina Sérica da Égua Gestante (<i>pregnant mare's serum gonadotropin</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RVG	Rompimento da vesícula germinativa
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Sintetic Oviduct Fluid
SrCl ₂	Cloreto de estrôncio
TALP	Tyroses com Albumina, Lactato e Piruvato
TCM-199	Meio de cultivo de tecido (<i>Tissue Culture Medium 199</i>)
Thr 14	Treonina 14
Thr 161	Treonina 161
TI	Telófase I
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
Tyr 15	Tirosina 15
UI	Unidade internacional
VG	Vesícula germinativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES EM PRIMATAS.....	16
2.1.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões na espécie <i>Cebus apella</i>	21
2.2 MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....	24
2.2.1 Maturação nuclear	24
2.2.2 Maturação citoplasmática	25
2.2.3 Controle citoplasmático da maturação nuclear envolvido por proteínas reguladoras da maturação	26
2.2.3.1 MPF.....	26
2.2.3.2 Mapk.....	28
2.2.4 Maturação oocitária e interação oócito - células somáticas circundantes	28
2.2.5 Maturação oocitária <i>in vitro</i>	30
2.3 COMPETÊNCIA E ATIVAÇÃO OOCITÁRIA.....	31
2.3.1 Ativação oocitária provocada por estímulos de Ca⁺²	32
2.4 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA.....	33
2.4.1 Agentes ativadores	34
2.4.1.1 Ionomicina.....	35
2.4.1.2 6-DMAP.....	36
2.4.1.3 Roscovitina.....	36
3 ARTIGO CIENTÍFICO	38
4 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Cebus apella*, popularmente conhecida como macaco-prego, é considerada um importante modelo para ser usado na pesquisa biomédica (HEARN, 1994; DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006). Estudos descrevendo alguns parâmetros sobre a fisiologia reprodutiva já foram realizados nesta espécie (WRIGHT; BUSH, 1977; NAGLE et al., 1979; NAGLE et al., 1980; LINN et al., 1995; ORTIZ et al., 2005; DOMINGUES et al., 2003; DOMINGUES et al., 2007; DOMINGUES et al., 2010). Em *C. apella* foi descrita a maturação *in vitro* (MIV) em 36 h de cultivo dos oócitos puncionados dos folículos antrais no 9º dia do ciclo menstrual (DOMINGUES et al., 2010). No entanto, estudos relacionados à produção *in vitro* de embriões (PIVE) por meio da fecundação *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e transferência nuclear de células somáticas (TNCS) ou embrionárias ainda não foram realizados nesta espécie.

Um dos principais fatores que limitam o desenvolvimento da PIVE em *C. apella* é a obtenção de espermatozoides viáveis, considerando que o sêmen é formado por coágulo seminal de difícil manipulação (ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011), bem como a falta de protocolos de capacitação espermática que dificultam o emprego dessa biotécnica. Outro fator limitante é a ausência de parâmetros substanciais que embasem a validação do protocolo de MIV já descrito para essa espécie, como a dinâmica da expansão das células do *cumulus* e a competência oocitária após 36 h de cultivo *in vitro*.

A maturação oocitária é responsável por tornar o gameta feminino apto à fecundação ou à ativação partenogenética (capacitação oocitária), bem como para o desenvolvimento embrionário subsequente (HYTTEL et al., 1997; JIMENEZ-MACEDO et al., 2006). Na maioria dos mamíferos, a maturação dos oócitos (competência meiótica) é caracterizada pela progressão do estágio de diplóteno (vesícula germinativa - VG) até alcançar a metáfase II (MII), evidenciada pela extrusão do 1º corpúsculo polar (CP) (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001; MEHLMANN, 2005). *In vitro*, a maturação oocitária começa a partir do momento em que os oócitos são retirados dos folículos ovarianos e colocados em meios de cultivo apropriados sem a utilização de tratamento hormonal (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Dentro dos folículos, os oócitos estão em íntima interação com as células

somáticas que os circundam (células do *cumulus*), trocando mensagens importantes para obter competência meiótica (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004). A importância das células do *cumulus* e da sua expansão, durante o processo da maturação oocitária *in vivo* é clara, e tem sido bastante utilizada nos sistemas de cultivo *in vitro* em algumas espécies de mamíferos (SUN et al., 2001; TANGHE et al., 2002; GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

Outro parâmetro para se avaliar a capacitação oocitária seria descrever o processo da ativação partenogenética, pois os oócitos que completaram sua maturação, podem se desenvolver embrionariamente na ausência da contribuição paterna e sem a redução meiótica dos cromossomos (ALBERIO et al., 2001; BREVINI; GANDOLFI, 2008; PAFFONI et al., 2008). A ativação partenogenética é considerada um possível meio para a produção de embriões homogêneos com a mesma ploidia (MARSHALL; WILTON; MOORE, 1998; VARGA et al., 2008) e um excelente modelo utilizado para a avaliação do desenvolvimento citoplasmático do oócito, pois não há intervenção de fatores ligados ao espermatozóide (SUSKO-PARRISH et al., 1994; DE SOUSA et al., 2002). Nos mamíferos, a ativação partenogenética é realizada artificialmente, com a utilização de agentes ativadores (ionomicina, etanol, cloreto de estrôncio) que desencadeiam oscilações de cálcio (Ca^{+2}) dentro do oócito, imitando a função do espermatozóide no momento da fecundação (BREVINI; GANDOLFI, 2008; PAFFONI et al., 2008). A associação dos ativadores de Ca^{+2} com os inibidores proteicos, como a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), ciclohexamida e roscovitina são bastante utilizadas nos protocolos de ativação (BREVINI; GANDOLFI, 2008), pois promovem melhores resultados no desenvolvimento embrionário nos bovinos (SUSKO-PARRISH et al., 1994; CIBELLI et al., 1998; SHEN et al., 2008), nos suínos (VARGA et al., 2008), nos ovinos (SCHNIEKE et al., 1997), nos coelhos (LIU et al., 2002) e nos primatas (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001).

A hipótese deste trabalho é que os oócitos de *C. apella* maturados *in vitro* por 36 h apresentam grau máximo de expansão das células do *cumulus* e que este é um parâmetro para validar a capacitação oocitária para o desenvolvimento embrionário, a partir da fecundação *in vitro* e ativação partenogenética, utilizando ionomicina em associação com 6-DMAP e roscovitina.

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a competência oocitária em *C. apella*, dos oócitos que foram maturados *in vitro*, relacionando-a com a expansão das células do *cumulus* e com a PIVE, por meio dos mecanismos da ativação partenogenética e da

FIV; e mais especificamente, comparar os protocolos da ativação partenogénica utilizando ionomicina em associação com 6-DMAP ou com roscovitina, verificando a formação de zigotos, formação pronuclear e taxa de clivagem dos embriões formados a partir da ativação partenogénica e da FIV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM PRIMATAS

Na busca de se obter informações básicas sobre os mecanismos reprodutivos dos animais, além de tentar diminuir os problemas de infertilidades e contribuir na diversidade genética, originou os estudos sobre as biotécnicas da reprodução (DURRANT, 2009). Nos primatas, uma notável progressão na aplicação dessas biotécnicas tem sido realizada nos últimos 20 anos (WOLF, 2004), promovendo a produção *in vitro* de embriões (PIVE) a partir da inseminação artificial (IA), fecundação *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) e transferência nuclear por células somáticas (TNCS) ou embrionárias (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006; ANDRABI; MAXWELL, 2007; ZHENG, 2007).

Nos primatas, as biotécnicas reprodutivas que necessitam da utilização do gameta masculino possuem um fator limitante devido à dificuldade de obtenção de espermatozóides viáveis (OLIVEIRA et al., 2011). O sêmen de alguns primatas é constituído por uma fração líquida e por uma coagulada, que se forma imediatamente após a ejaculação (DIXSON; ANDERSON, 2002). A fração coagulada, também denominada de coágulo seminal, apresenta um aspecto gelatinoso e firme de difícil dissolução que possui uma alta concentração espermática (NAGLE; DENARI, 1983; VANDEVOORT, 2004; HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2008). Uma hipótese para a formação do coágulo seminal nos primatas se moldando no contorno da vagina após a cópula é a sua principal função de impedir a inseminação por outros machos (DIXSON; ANDERSON, 2002). Alguns trabalhos descreveram protocolos para facilitar a dissolução do coágulo seminal e ter sucesso na aplicação das biotécnicas da reprodução, tanto pela utilização do sêmen a fresco como criopreservado, pois essa fração é a que contém maior concentração de espermatozóides (ROUSSEL; AUSTIN, 1969; HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

A biotécnica da reprodução utilizada há mais tempo nos primatas é a IA (SETTLAGE; SWAN; HENDRICKX, 1973). O baixo custo e a eficiência nos resultados dão garantia para sua utilização (MORRELL et al., 1998; HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2007). A inseminação artificial envolve a transferência do ejaculado à fresco ou criopreservado para dentro do trato reprodutor feminino, sem a manipulação

nos oócitos (DURRANT, 2009). No entanto, o potencial de coleta de espermatozóides viáveis nos primatas ainda é restrito (WOLF, 2009), devido a rápida perda da motilidade espermática após a ejaculação e processos de criopreservação (TOLLNER et al., 1990; WOLF et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2011). O conhecimento prévio da fisiologia do gameta masculino é adequado para a aplicação da IA e das outras biotécnicas da reprodução (ANDRABI; MAXWELL, 2007; DURRANT, 2009). A fecundidade é essencial para os espermatozóides possuírem uma progressiva motilidade que suporte o transporte do ejaculado para o interior do trato reprodutor feminino, penetrando conseqüentemente nos oócitos (MORRELL et al., 1998; DURRANT, 2009; WOLF, 2009).

O primeiro trabalho descrevendo a FIV nos primatas ocorreu na espécie *Saimiri sciureus* (KUEHL; DUKELOW, 1979). Esta biotécnica pode ser realizada tanto pela coleta de oócitos maturados *in vivo*, obtidos pelo tratamento hormonal que promove a estimulação do desenvolvimento folicular nos ovários (KUBISCH et al., 2006; YIN; DUFFY; GOSDEN, 2006; CURNOW et al., 2010a), como pela coleta de oócitos ainda imaturos, submetendo-os logo em seguida em meios de cultivo *in vitro* apropriados para ocorrer a maturação oocitária *in vitro* (MIV) (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Nos primatas, o protocolo de maturação *in vivo* promove uma maior quantidade de oócitos obtidos por fêmea, sendo utilizado com mais frequência na FIV (BAVISTER et al., 1983; WOLF et al., 1989; SANKAI et al., 1994; MARSHALL; WILTON; MOORE, 1998). No entanto, os primatas submetidos a esses tratamentos podem não responder aos estímulos hormonais ou podem sofrer a síndrome hiperestimulação ovariana, acometida nas fêmeas que possuem ovários policísticos (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001; JUREMA; NOGUEIRA, 2006; ZHENG, 2007; GRØNDAHL, 2008). Dessa forma, a MIV nos primatas também torna esses animais como modelos biomédicos, servindo para mulheres que possuem algumas alterações ovarianas (ZHENG, 2007). A grande vantagem da FIV é a diminuição do descarte precoce das fêmeas que possuem alguma alteração e que por este motivo, são impedidas de se reproduzir por meio natural (ANDRABI; MAXWELL, 2007). A sua aplicação ocorre principalmente em situações de infertilidade (principalmente nos humanos) (SCHRAMM; BAVISTER, 1999; TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001; JUREMA; NOGUEIRA, 2006), nos animais com valor produtivo (THIBIER, 2005) e nas espécies em via de extinção (ANDRABI; MAXWELL, 2007). Um dos fatores que limitam a sua aplicação é a obtenção de sêmen com baixa taxa de motilidade

espermática ou quando não é coletada uma grande quantidade de ejaculado (DURRANT, 2009).

Na busca de encontrar alternativas para solucionar alguns casos de infertilidade quando a FIV é utilizada, surgiu a ICSI (*intracitoplasmatic sperm injection*) (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000; MIYARA et al., 2003). Esta técnica se fundamenta na inserção mecânica de um espermatozóide inteiro ou do núcleo espermático isolado dentro do ooplasma (MARTINS; SILVA; RUMPF, 2002). Nos mamíferos, esta técnica foi descrita primeiramente em hamster (UEHARA; YANAGIMACHI, 1976) e a partir deste trabalho foi sendo expandida nos outros mamíferos (PALERMO et al., 1992; KURETAKE et al., 1996) e nos primatas (HEWITSON et al., 1996). Em algumas espécies como os humanos e equinos, a microinjeção é suficiente para ativar os oócitos e continuar o desenvolvimento embrionário (VAN STEIRTEGHEM et al., 1993; GALLI et al., 2002). Nos bovinos e ovinos é necessário usar protocolos de ativação artificial nos oócitos (ativação partenogenética) para induzir o gameta feminino a completar a meiose e seguir o desenvolvimento embrionário (ABDALLA et al., 2009; SHIRAZI et al., 2009). Nos primatas, a ativação artificial foi utilizada em macacos rhesus (HEWITSON et al., 1996), no entanto, não pode ser afirmada que a ativação é necessária em todas as espécies. Com relação ao tipo de sêmen utilizado para a ICSI nos primatas, o uso de sêmen à fresco (HEWITSON et al., 1996; NUSSER et al., 2001; SUN et al., 2008) ou congelado (MENG; WOLF, 1997; NG et al., 2002; YEOMAN et al., 2005; CURNOW et al., 2010b) vem sendo difundido com sucesso em várias espécies.

A transferência nuclear (clonagem) é definida como o processo no qual o núcleo (DNA) é removido de uma célula doadora (embrionária ou somática) e transferido para outra célula enucleada (oócito maturado), desenvolvendo embrionariamente e originando um indivíduo geneticamente igual ao do doador celular (ANDRABI; MAXWELL, 2007). Da mesma forma como ocorre em outros mamíferos, a produção de primatas clonados continua bastante limitada, sendo observado uma elevada taxa de mortalidade embrionária e fetal (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001). Para garantir a eficiência da transferência nuclear nos primatas é necessário compreender mais detalhadamente as funções nucleares e citoplasmáticas das células utilizadas neste processo em cada espécie (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001; ZHOU et al., 2006).

O primata mais estudado no campo das biotecnologias da reprodução é a espécie *Macaca mulatta* (macaco rhesus), já sendo descrita a IA (SETTLAGE; SWAN;

HENDRICKX, 1973), a FIV (BAVISTER et al., 1983), a ICSI (HEWITSON et al., 1996), a transferência nuclear (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001; MITALIPOV et al., 2002), assim como já foi relatado o primeiro nascimento de primatas por transferência nuclear de células embrionárias, obtidas a partir dos blastocistos produzidos pela ICSI (WOLF et al., 2004). Outros primatas como os macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*), saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e os macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) também vêm se destacando nas biotécnicas da reprodução assim como a espécie *M. mulata* (Quadro 1).

Espécie	Biotécnicas da reprodução				Publicações
	PIVE	Maturação oocitária	Estimulação hormonal	Tempo de cultivo	
<i>M. mulata</i>	FIV	<i>In vivo</i>	FSH+LH+hCG	X*	Wolf et al., 1989
			FSH+LH	36 h	Schramm; Bavister, 1994
			FSH+LH+hCG	X	Wu et al., 1996
			FSH+LH+hCG	X	Meng; Wolf, 1997
			FSH	36-40 h	Zheng et al., 2001
		MIV	x	48 h	Alak; Wolf, 1994
	FSH+LH		40 h	Schramm; Bavister, 1994	
	ICSI	<i>In vivo</i>	FSH+LH+hCG	X	Meng; Wolf, 1997
			FSH+LH+hCG	X	Mitalipov et al., 2001
			FSH+LH+hCG	X	Wolf et al., 2004
		MIV	X	48 h	Hewitson et al., 1996
	TNCS	<i>In vivo</i>	FSH+LH+hCG	X	Mitalipov et al., 2001
			FSH+LH+hCG	X	Mitalipov et al., 2002
			FSH + hCG	X	Zhou et al., 2006
<i>M. fascicularis</i>	FIV	<i>In vivo</i>	PMSG + hCG	24-48 h	Sankai et al., 1994
			FSH + hCG	X	Sun et al., 2008
			FSH + hCG	x	Curnow et al., 2010a
		MIV	x	24-30 h	Curnow et al., 2010a
	ICSI	<i>In vivo</i>	FSH + hCG	X	Ng et al., 2002
			FSH + hCG eCG + hCG	X	Shimozawa et al., 2007
			FSH + hCG	X	Sun et al., 2008
			FSH + hCG	x	Curnow et al., 2010b
		MIV	x	24-30 h	Curnow et al., 2010b
	TNCS	<i>In vivo</i>	FSH + hCG	X	Chen et al., 2007
<i>S. sciureus</i>	FIV	<i>In vivo</i>	hCG	X	Kuehl; Dukelow, 1979
			FSH + hCG	X	Asakawa; Dukelow, 1982
<i>C. jacchus</i>	FIV	<i>In vivo</i>	hCG	X	Wilton et al., 1993
			FSH	22 h	Gilchrist et al., 1997
			hCG	X	Marshall et al., 1998
			FSH + hCG	26-30 h	Grupen et al., 2007
	ICSI	<i>In vivo</i>	FSH + hCG	26-30 h	Grupen et al., 2007

Quadro 1: Biotécnicas da reprodução visando a PIVE em algumas espécie de primatas.

* X- ausência

2.1.1 Produção *in vitro* de embriões na espécie *Cebus apella*

A espécie *C. apella*, conhecida popularmente como macaco-prego (Figura 01), se destaca pela sua ampla utilização nas pesquisas biomédicas (HEARN, 1994; FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998). Esta espécie possui um grande potencial para aplicação das biotecnologias da reprodução (DOMINGUES et al., 2007) devido à aproximação filogenética com os humanos (WOLF, 2004) e por ser um modelo experimental para as espécies de primatas em via de extinção (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006). Apesar dos vários estudos utilizando a espécie *C. apella*, a produção de embriões *in vitro* ainda não foi descrita para a espécie. O conhecimento prévio sobre os mecanismos da biologia e fisiologia reprodutiva da espécie estudada é fundamental para aumentar o seu potencial reprodutivo e auxiliar na aplicação das biotécnicas da reprodução (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006).

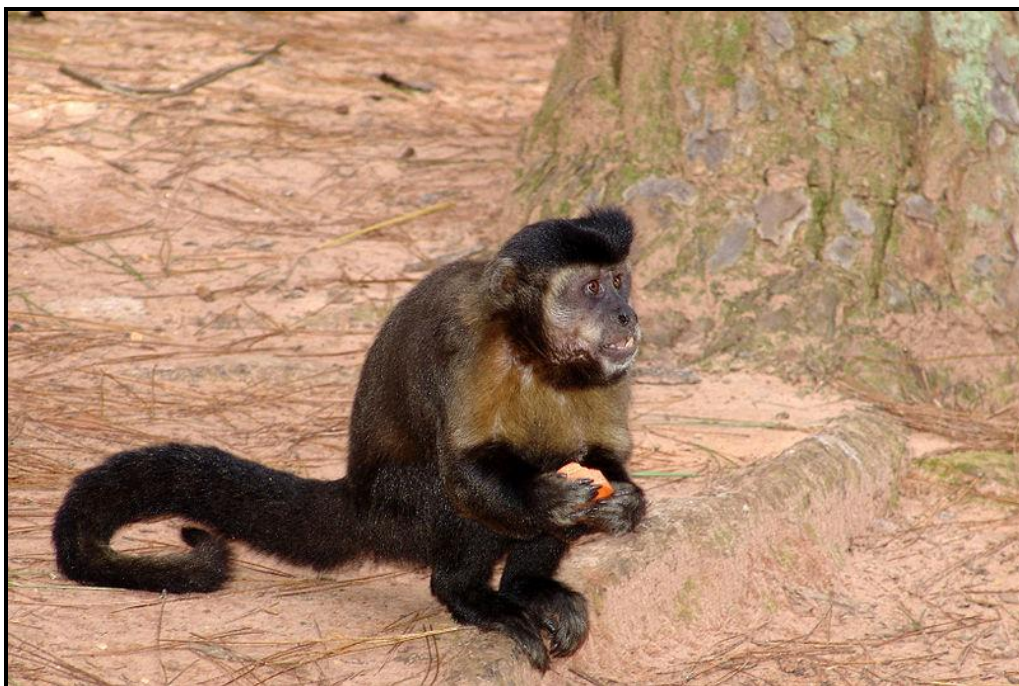


Figura 1: Representante da espécie *Cebus apella*. Acessado em 24 de janeiro de 2011. (Fonte:http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Macaco-prego_Manduri_151207_15.JPG).

Assim como acontece em outras espécies de primatas, o sêmen de *C. apella* coagula rapidamente após a ejaculação (Figura 02) (NAGLE; DENARI, 1983; ARAÚJO et al., 2009). Esta característica dificulta o emprego de biotécnicas da

reprodução como a IA e FIV, pois o coágulo obtido possui uma grande concentração de espermatozoides, mas com baixa ou nenhuma motilidade espermática (ARAÚJO et al., 2009). Estudos descrevendo a obtenção de espermatozoides por eletroejaculação (ARAÚJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011); a diluição do sêmen utilizando água de coco *in natura* (ARAÚJO et al., 2009) e água de coco em pó (ACP-118[®]) (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011); e a ativação espermática utilizando cafeína após a dissolução do coágulo (OLIVEIRA et al., 2011), foram realizados em *C. apella* com o intuito de maximizar o aproveitamento do sêmen para introdução de biotécnicas da reprodução.



Figura 2: a) Ejaculação na espécie *C. apella*; b) coágulo seminal obtido após eletroejaculação.

Fonte: Domingues, S.F.S.

Alguns aspectos da fisiologia reprodutiva da fêmea de *C. apella* já foram descritos. Dentre eles se destaca o estudo do ciclo menstrual, com duração média de 18-21 dias (WRIGTH; BUSH, 1979; NAGLE et al., 1979; DOMINGUES et al., 2003); a ovulação ocorrendo entre o 8^o-11^o dia do ciclo (DOMINGUES et al., 2007); e a descrição das fases do seu ciclo obtida por citologia vaginal (WRIGHT; BUSH, 1977; LINN et al., 1995), determinação das concentrações plasmáticas dos hormônios ovarianos (NAGLE et al., 1979) e por ultrassonografia (ORTIZ et al., 2005).

Foi demonstrado em *C. apella* a ovulação de um único folículo ocorrendo entre 10-24 h após o pico de estradiol (NAGLE et al., 1980), sendo que o diâmetro do folículo pré-ovulatório alcança 8-9 mm antes de ser ovulado (ORTIZ et al., 2005; DOMINGUES et al., 2007). A recuperação dos oócitos imaturos de *C. apella* a partir

dos folículos pré-antrais e antrais foi obtida por meio da laparotomia (Figura 03) (DOMINGUES et al., 2003; DOMINGUES et al., 2007), obtendo 2-5 oócitos por animal pela punção dos folículos antrais medindo 2-9 mm de diâmetro, apenas acompanhando o ciclo pela colpocitologia e crescimento folicular por meio da ultrassonografia, sem necessidade de estimulação hormonal (DOMINGUES et al., 2007).

Na espécie *C. apella* foi descrito a obtenção de oócitos imaturos, pela punção dos folículos antrais, para serem estudados quanto ao perfil protéico oocitário e das suas células circundantes (células do *cumulus*), bem como para analisar a competência meiótica em 24 e 36 h de MIV, demonstrando que foi alcançada a partir de 36 h de cultivo *in vitro* (DOMINGUES et al., 2010). O perfil proteico encontrado nos oócitos e nas células do *cumulus* de *C. apella* foi semelhante ao peso molecular das proteínas envolvidas no controle da maturação oocitária (DOMINGUES et al., 2010). No entanto, não foi realizado outros parâmetros que confirmam que em 36 h de MIV são suficientes para ocorrer a completa maturação dos oócitos.

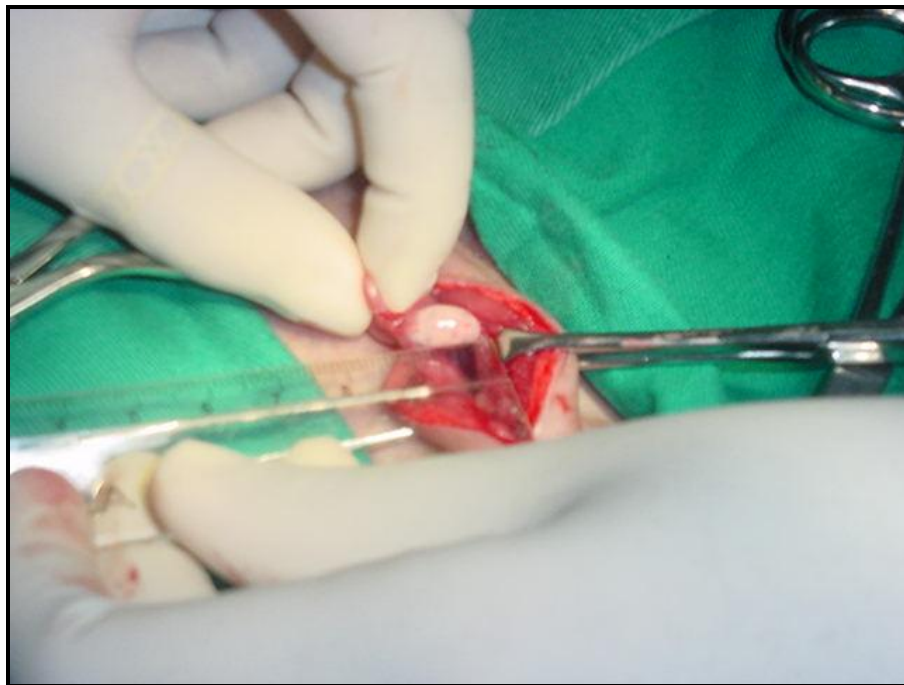


Figura 3: Laparotomia realizada em *C. apella* para obtenção de oócitos por punção folicular.

Fonte: Domingues, S.F.S.

2.2 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

O ponto de partida da linhagem gametogênica feminina é representado pelas oogônias, as quais são oriundas das células germinativas primordiais (FAIR, 2003; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Durante o desenvolvimento fetal da maioria dos mamíferos, ocorre no interior do ovário a multiplicação das oogônias, a partir de diversas divisões mitóticas, iniciando posteriormente a 1ª divisão meiótica que originará os oócitos (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998; MEHLMANN, 2005). Nesta fase, o gameta feminino transita pelo estágio da prófase I (PI) de leptóteno, zigóteno, paquíteno e parando em diplóteno, também denominado de dictióteno ou vesícula germinativa (VG) até completar o seu crescimento (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; WEHREND; MEINECKE, 2001; FAIR, 2003).

A retomada da meiose ocorre na puberdade após a indução dos picos pré-ovulatórios do hormônio luteinizante (LH) (PINCUS; ENZMANN, 1935; BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; WEBB et al., 2002; MEHLMANN, 2005). Dentro do folículo ovariano, o oócito completa a sua maturação, a partir de uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos que são ligados a várias mudanças bioquímicas e estruturais (SCHRAMM; BAVISTER, 1999; TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001; GRØNDAHL, 2008). O oócito maturado está apto a ser fecundado e progredir pelas primeiras divisões da clivagem até que os genes embrionários sejam expressos (WEHREND; MEINECKE, 2001; ASSOU et al., 2006).

2.2.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear dos oócitos consiste na retomada da meiose, a partir do evento conhecido como rompimento da vesícula germinativa (RVG), no qual há a dissolução do envelope nuclear, condensação cromossômica, formação do fuso mitótico e separação dos cromossomos (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001; KOTANI; YAMASHITA, 2002). Na maioria dos mamíferos, o oócito sai da fase de diplóteno da PI, progride pelas fases da metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI) até alcançar a metáfase II (MII), a qual é evidenciada pela extrusão do 1º corpúsculo polar (CP) e estágio em que ocorre a segunda parada da meiose (AVERY et al., 1998). A meiose é

completada quando se obtêm sucesso na fecundação, visualizada pela presença do 2º CP (GRØNDAHL, 2008).

2.2.2 Maturação citoplasmática

A complexidade dos eventos ocorridos na maturação oocitária não depende somente da eficiente dinâmica de separação cromossômica na maturação nuclear, mas também da redistribuição das organelas citoplasmáticas e da síntese e acúmulo de RNAm, proteínas e fatores de transcrição (GRØNDAHL, 2008; JUREMA; NOGUEIRA, 2006; FERREIRA et al., 2009). A assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos aumenta a ocorrência de polispermia, inviabilizando o desenvolvimento embrionário normal (DUCCIBELLA, 1996; WEHREND; MEINECKE, 2001; MIYARA et al., 2003).

As principais mudanças estruturais das organelas citoplasmáticas durante a maturação oocitária são observadas tanto pela morfologia quanto pela redistribuição. O tráfego das organelas citoplasmáticas é realizado por componentes do citoesqueleto, como os microfilamentos e microtúbulos (FERREIRA et al., 2009). Dentro do citoplasma oocitário irão ocorrer diversas modificações após o RVG como: gradativa diminuição do complexo de Golgi, devido ao aparecimento de vesículas de Golgi durante o RVG; migração das mitocôndrias e de gotas lipídicas para áreas de grande consumo de energia dos oócitos e dos blastômeros embrionários; localização mais superficial dos grânulos corticais no final da maturação (MII), além da redução do espaço citoplasmático, devido o alargamento no espaço perivitelineo causado pelo aparecimento do 1º corpúsculo polar (HYTTEL et al., 1997; FERREIRA et al., 2009).

A poliadenilação (adição de adenina a porção 3' terminal do RNAm) é o principal mecanismo de tradução das proteínas que atuam sobre o RNAm materno estocado durante a maturação molecular (FERREIRA et al., 2009). Inúmeras proteínas e moléculas marcadoras da maturação citoplasmática são transcritas durante essa fase, sendo que as proteínas derivadas do RNAm materno estão envolvidas tanto na maturação oocitária, quanto nos eventos celulares subsequentes como a fecundação, formação dos pronúcleos e embriogênese inicial, e devem ser estocadas até sua utilização (SIRARD, 2001).

2.2.3 Controle citoplasmático da maturação nuclear envolvido por proteínas reguladoras da maturação

A descoberta da atividade de um fator citoplasmático que é capaz de induzir a maturação oocitária foi descrita primeiramente nos oócitos de anfíbios (MASUI; MARKET, 1971; SMITH; ECKER, 1971). Esses trabalhos mostraram que quando o citoplasma dos oócitos em MII foi injetado em oócitos imaturos, ocorreu a retomada da meiose sem o acréscimo de estímulos hormonais. Diante disso, foi concluído que os oócitos maturados possuem algum elemento que promove a maturação.

As duas principais proteínas envolvidas na regulação da maturação oocitária são o fator promotor da maturação (MPF - *maturation promoting factor*) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK - *mitogen activated protein kinase*), as quais mostram atividades oscilantes durante o processo de maturação (WHITAKER, 1996; WEHREND; MEINECKE, 2001; JIMENEZ-MACEDO et al., 2006).

O MPF promove a transição da fase G2 para a fase M nos eucariotos, ou seja, é responsável pela síntese de DNA e pela divisão celular (MASUI; MARKET, 1971). Enquanto que a MAPK está envolvida na regulação da dinâmica dos microtúbulos e na organização do fuso mitótico (VERLHAC et al., 1994; FAN; SUN, 2004).

2.2.3.1 MPF

O MPF é um heterodímero formado por duas subunidades, uma subunidade catalítica ($p34^{cdc2}$) e uma subunidade reguladora (ciclina B), consistindo em um membro das proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDK - *cyclin dependent kinase*) (LOHKA; HAYES; MALLER, 1988;). A regulação da atividade do MPF é dependente da associação das suas duas subunidades e do estado de fosforilação, sendo a subunidade catalítica sintetizada constantemente e a subunidade reguladora degradada ciclicamente (WHITAKER, 1996; LIU; YANG, 1999). Para ser realizada a ativação do MPF, os níveis de ciclina B devem ser elevados, enquanto que a $p34^{cdc2}$ deve ser desfosforilada posteriormente em dois aminoácidos presentes nos sítios ativos (GAUTIER et al., 1990; LIU; YANG, 1999).

Após a fecundação ou da ativação artificial, os níveis de ciclinas declinam drasticamente e se reacumulam durante os primeiros ciclos celulares do embrião (LIU; YANG, 1999). Na fase M, a inativação do MPF ocorre inicialmente pela degradação da ciclina, realizada pelo complexo promotor de anáfase (APC – *anaphase promoting component*) (GLOTZER; MURRAY; KIRSCHNER, 1991; KING et al., 1996). A sua degradação é realizada por ubiquitinação (LORCA et al., 1992; LIU; YANG, 1999), ou seja, um complexo de enzimas reconhece uma sequência específica de aminoácidos nas ciclinas e fixa nelas múltiplas cópias de ubiquitinas, marcando a proteína para a destruição completa nos proteossomos (KING et al., 1996; ALBERTS et al., 2004).

O segundo evento que regula a atividade do MPF ocorre na sua subunidade catalítica. Para continuar a ativação do MPF, a p34^{cdc2} deve ser desfosforilada pela fosfatase cdc25, no sítio onde se encontra a treonina 14 (Thr 14) e a tirosina 15 (Tyr 15), além de ocorrer a fosforilação da treonina 161 (Thr 161) (NORBURY; NURSE, 1992; ALBERIO et al., 2001). A inativação do MPF acontece com a presença da enzima Wee1, a qual promove a fosforilação da Thr 14 e da Tyr 15 (JIMENEZ-MACEDO et al., 2006).

Na maioria dos mamíferos, o ciclo celular nos oócitos é bloqueado em MII devido ao aumento do MPF (MASUI; MARKET, 1971; DEKEL, 1996). A oscilação do MPF é necessária para a transição meiótica e mitótica (WEHREND; MEINECKE, 2001). Na fase PI (estágio VG), o MPF está em concentrações basais e a ativação do MPF promove a transição da PI para MI, aumentando gradualmente seus níveis até atingir o pico em MI (COMBELLES et al., 2005). Entre as fases AI e TI, ocorre um declínio transitório do MPF, concomitante com a ausência de Ca⁺² durante esse período (WU et al., 1997). Nos oócitos em MII, os níveis do MPF aumentam novamente e são mantidos nessa concentração pelo fator citostático (CSF - *cytostatic factor*) que é composto por pelo menos três proteínas: c-mos, p39^{rsk} e MAPK (ALBERIO et al., 2001). Uma das funções do c-mos é inativar o APC e desta forma, não deixa a ciclina ser degradada (WHITAKER, 1996; FLORMAN; DUCIBELLA, 2006). A inativação do CSF ocorre no momento da fecundação ou da ativação artificial, causada pelo aumento de Ca⁺² intracelular (LIU; YANG, 1999; ALBERIO et al., 2001; FISSORE et al., 2002). O produto p39^{Rsk} é uma proteína cálcio-sensível que tem duas funções principais, uma agindo no momento da maturação meiótica e a outra durante a estabilização do fuso metafásico (NORBURY; NURSE, 1992).

2.2.3.2 MAPK

A MAPK, também conhecida como quinase reguladora por sinal extracelular (ERK - *extracellular signal-regulated kinases*), é uma serina-treonina quinase, altamente conservada nos organismos eucarióticos, sendo formada por pelo menos duas subunidades, a p42 (ERK2) e a p44 (ERK1) (HARROU; CLARKE, 1995; FERRELL Jr, 1999). Os membros da família das MAPKs são ativados por uma cascata dependente de proteínas quinases, participando na transmissão de sinais a partir da superfície celular em direção ao citoplasma e núcleo (ACHARYA et al., 1998). As MAPKs são consideradas muito importantes na regulação da transição da MI para a MII e principalmente na manutenção da fase MII, onde alcança o seu nível máximo (FERRELL Jr, 1999; FISSORE et al., 2002).

As vias de transdução de sinais intracelulares consistem em proteínas específicas (c-mos) que ativam as MAP quinases quinases (MAPKK ou MEK), com subsequente fosforilação e ativação das MAPKs (KRISCHEK; MEINECKE, 2001). A fosforilação das MAPKs e os dos seus ativadores como a p90^{rsk}, a qual inibe a quinase Myt1, facilita a ativação do MPF mediada pela cdc25 (LIU; YANG, 1999). Dessa forma, a cascata MOS/MEK/MAPK/p90^{Rsk} atua diretamente na ativação e estabilidade do MPF durante a transição G2/M no momento da maturação oocitária (NORBURY; NURSE, 1992).

2.2.4 Maturação oocitária e interação oócito - células somáticas circundantes

A habilidade oocitária para crescer e ter competência meiótica é adquirida também por interações mútuas entre os oócitos e as células somáticas que os circundam (células da granulosa do *cumulus* e células da granulosa murais) durante a oogênese (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; ASSOU et al., 2006; ZHENG, 2007). As células da granulosa transferem alguns nutrientes e fatores essenciais que direcionam a maturação oocitária (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004; ALI et al., 2005) e também são importantes para o processo da ovulação, capacitação espermática e fecundação (TANGHE et al., 2002). Essas funções são consequências do íntimo contato entre o oócito e as células somáticas circundantes (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004; ALI et al., 2005).

As características funcionais mais marcantes entre as células somáticas que circundam o oócito é que as células da granulosa murais são responsáveis pelo contorno da parede do folículo, formando um epitélio estratificado com a lâmina basal (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004) e que somente as células do *cumulus* possuem uma alta taxa de proliferação e capacidade de mucificar e expandir, além de uma baixa capacidade esteroidogênica e de expressão do LH (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

As células do *cumulus* oferecem ao oócito metabólitos, aminoácidos, adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e purinas (KIDDER; MHAWI, 2002; GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004). O envio desses componentes é bilateral, sendo realizado por junções comunicantes (junções gap) e por interações paracrinas (KA et al., 1997; KIDDER; MHAWI, 2002). Diante disso, formam o complexo *cumulus-oophorus* (CCO) (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

As junções comunicantes (gap) são formadas por hexâmeros de proteínas pertencentes à família das conexinas (GRAZUL-BILSKA; REYNOLDS; REDMER, 1997; DELL'AQUILA et al., 2004), que atuam como canais transmembranas (KA et al., 1997). As projeções transmembranas por meio das junções gap atravessam a zona pelúcida e entram em contato com a membrana do oócito permitindo a troca de informação e de pequenas moléculas (ALBERTINI et al., 2001).

A retomada da meiose em algumas espécies está relacionada à redução do nível das conexinas nos CCOs (GRAZUL-BILSKA; REYNOLDS; REDMER, 1997; MARCHAL et al., 2003). Quando as células do *cumulus* são estimuladas pelos hormônios endógenos e por fatores produzidos pelo oócito, passam a produzir ácido hialurônico, o qual promove o aumento na distância entre as células do *cumulus* e a redução do contato entre o oócito e essas células (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; SUZUKI; JEONG; YANG, 2000). Esse processo de distanciamento é denominado de expansão do *cumulus* ou mucificação, sendo essencial para os eventos da ovulação, capacitação espermática e fecundação (TANGUE et al., 2002).

Dentro do folículo, o oócito mantém contato com as células do *cumulus* até a MI, diminuindo gradativamente essa relação durante a progressão para o estágio da MII, momento em que ocorre a sua ovulação (MOTLIK; FULKA; FLÉCHON, 1986). *In vitro*, os oócitos perdem o contato com essas células imediatamente após o início da maturação (PINCUS; ENZMANN, 1935). Os melhores resultados da maturação, fecundação e do desenvolvimento embrionário são obtidos quando estas células estão

presentes no meio de cultivo *in vitro* (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; IKEDA et al., 2006).

Devido às interações bilaterais que possuem um papel essencial na oogênese, a interrupção que ocorre quando os oócitos são liberados dos folículos e cultivados *in vitro*, poderá comprometer a competência meiótica dos oócitos maturados *in vitro* (ZHENG et al., 2006). O dano causado por essa separação é dependente de vários fatores, incluindo as propriedades intrínsecas que os folículos possuem (tamanho e atresia) e os componentes do cultivo *in vitro* (ZHENG, 2007). Em bovinos, a expansão das células do *cumulus* no momento da recuperação do oócito está associada à atresia folicular, sendo este um critério de exclusão na seleção dos oócitos submetidos à MIV (BLONDIN; SIRARD, 1995). Em humanos, a expansão total das células do *cumulus* está diretamente relacionada à maturação citoplasmática (TESTART et al., 1983).

2.2.5 Maturação oocitária *in vitro*

A maturação oocitária *in vitro* (MIV) é uma biotecnologia reprodutiva que permite que os oócitos sejam maturados fora do seu ambiente natural (PINCUS, ENZMANN, 1935). A MIV é promovida sem a necessidade submeter às fêmeas à uma prévia estimulação hormonal exógena para ocorrer o crescimento folicular *in vivo* (JUREMA; NOGUEIRA, 2006). A remoção artificial dos oócitos ainda imaturos de dentro dos folículos antrais, submetendo-os ao cultivo *in vitro* apropriado define a MIV (JIMENEZ-MACEDO et al., 2006; GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

Os meios de cultivo *in vitro* para maturação oocitária são constituídos por um meio base, formulado originalmente para cultivo de tecidos (TCM199 – *tissue culture medium 199*) ou de células somáticas (MEM – *minimal essencial medium*) (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Esses meios são modificados de acordo com os protocolos usados em cada laboratório, mas geralmente são adicionados tampões (HEPES, bicarbonato de sódio), hormônios gonadotróficos (FSH, LH), componentes energéticos (piruvato), fatores de crescimento (EGF - *epidermal growth factor*), aminoácidos essenciais, antioxidantes, soro e antibióticos (ZHENG et al., 2001; COMBELLES et al., 2005; GILCHRIST; THOMPSON, 2007; ZHENG, 2007; CURNOW et al., 2010ab).

O tempo do cultivo *in vitro* para maturação dos oócitos é bastante diferente entre as espécies de mamíferos. A MIV ocorre geralmente entre 18 a 24 h nos bovinos (WEHREND; MEINECKE, 2001), em 24 h nos ovinos (SHIRAZI et al., 2009) e 48 h nos suínos (WEHREND; MEINECKE, 2001). Nos humanos, a MIV dura entre 24 - 48 h (JUREMA; NOGUEIRA, 2006) e nos primatas a diferença varia muito de espécie para espécie. Nos macacos rhesus a MIV ocorre entre 36 - 40 h (ZHENG et al., 2001), em *C. jacchus* ocorre entre 22 - 24 h (GILCHRIST; NAYUDU; HODGES, 1997; DELIMITREVA et al., 2003) e na espécie *C. apella* foi descrito a ocorrência em 36 h (DOMINGUES et al., 2010).

A MIV disponibiliza uma oportunidade na sua aplicação devido à redução dos seus elevados custos e por diminuir as inconveniências e riscos (portadoras da síndrome da hiper-estimulação ovariana/síndrome do ovário policístico) promovidos pelos tratamentos hormonais que induzem a ovulação (COMBELLES et al., 2005; ZHENG, 2007). Além disso, esta técnica aparece como uma alternativa para mulheres que passaram por tratamentos de quimioterapia, promovendo oportunidades reprodutivas como a criopreservação de oócitos ou de ovários (COMBELLES et al., 2005).

2.3 COMPETÊNCIA E ATIVAÇÃO OOCITÁRIA

Competência oocitária é definida com a habilidade do oócito em completar a maturação, ter sucesso na fecundação (garantida pela fecundação monospermica) e lograr os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 1997). Durante o processo de fecundação, a elevação de Ca^{+2} intracelular promovida pela penetração dos espermatozoides na zona pelúcida e posteriormente na membrana vitelina dos oócitos em MII, origina uma série de modificações bioquímicas e estruturais que irão causar a ativação do oócito (WHITAKER; PATEL, 1990; FISSORE et al., 2002). A ativação causada pela fecundação promove o desbloqueio ou a retomada da meiose nos oócitos, levando à extrusão do 2º CP; a descondensação da cromatina paterna e materna; a duplicação do DNA em cada genoma pronuclear; o rompimento do envelope pronuclear, permitindo a união dos genomas e formação do zigoto (singamia); o início das primeiras divisões mitóticas (clivagem) e posterior continuação embrionária (CAMPBELL et al., 1996; FLORMAN; DUCIBELLA, 2002; COTICCHIO et al., 2004).

Um dos principais fatores para conseguir a eficiência na competência oocitária é a maturação dos oócitos (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). O controle da maturação oocitária é modulado por proteínas quinases e fosfatases, que promovem respectivamente, fosforilação e desfosforilação (WEHREND; MEINECKE, 2001). A maioria das proteínas e dos fatores envolvidos nesse processo é sintetizada nas primeiras horas de cultivo *in vitro*, sendo necessárias desde a retomada da meiose até a ativação do genoma embrionário (WEHREND; MEINECKE, 2001; COTICCHIO et al., 2004).

2.3.1 Ativação oocitária provocada por estímulos de Ca^{+2}

Durante a ativação oocitária, obtida pela fecundação ou pela partenogênese, uma cascata de eventos é desencadeada para aumentar os níveis de Ca^{+2} intracelular (SHEN et al., 2008). A cascata é iniciada com o aparecimento de uma molécula pequena e hidrossolúvel, chamada de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que sai da membrana citoplasmática do oócito e se difunde rapidamente no citosol (FISSORE et al., 2002; ALBERTS et al., 2004). Quando o IP_3 alcança o retículo endoplasmático (RE), se liga aos canais dependentes de Ca^{+2} de IP_3 , que estão presentes na membrana do RE e conseqüentemente consegue abri-los (ALBERTS et al., 2004). A função principal do IP_3 é estimular a liberação de Ca^{+2} estocado no RE, aumentando sua concentração citosólica (LEE; YOON; FISSORE, 2006). O significado das oscilações de Ca^{+2} nos oócitos ainda não está totalmente estabelecido, mas é conhecido que o Ca^{+2} está envolvido nos eventos da exocitose dos grânulos corticais e da progressão do ciclo celular (DUCIBELLA et al., 2002).

A transdução do sinal citosólico de Ca^{+2} nos oócitos é realizada por proteínas de ligação ao Ca^{+2} (calmodulina), que estão presentes também em todas as células eucarióticas e funcionam como um receptor intracelular de Ca^{+2} , mediando muitos processos regulados por esse íon (ALBERTS et al., 2004; LEE; YOON; FISSORE, 2006). Algumas enzimas e proteínas de transporte de membrana (bombas de Ca^{+2} da membrana plasmática que transportam íons para fora da célula) são os alvos regulados pela calmodulina. Deste modo, quando a concentração intracelular Ca^{+2} aumenta, a bomba é ativada e os íons retornam aos níveis normais (ALBERTS et al., 2004). Os efeitos do Ca^{+2} são associados direto ou indiretamente com as quinases dependentes de

calmodulinas (CaMKII). Os sinais de Ca^{+2} promovem a ativação das CaMKII, as quais são requeridas para a destruição das ciclinas (mediadas pelo APC) (NANASSY et al., 2007).

2.4 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

Partenogênese é o processo pelo qual o oócito pode produzir um embrião sem a contribuição do gameta masculino (BREVINI; GANDOLFI, 2008). A ativação oocitária é importante para estudos citogenéticos do embrião, porque o cromossomo materno pode ser analisado independente do cromossomo paterno (VARGA et al., 2008).

Esse tipo de reprodução é bastante comum nos insetos como as formigas, moscas e abelhas, assim como em alguns vertebrados como os anfíbios, lagartos e cobras (BREVINI; GANDOLFI, 2008; PAFFONI et al., 2008). Nos mamíferos, a partenogênese ocorre *in vitro*, a partir da adição de tratamentos artificiais que mimetizam a função do espermatozóide em elevar a concentração de Ca^{+2} no citoplasma, provocando inicialmente a diminuição da atividade do MPF e logo em seguida da MAPK (PERECIN et al., 2007; SHEN et al., 2008; RASCADO et al., 2010).

Na partenogênese, alguns agentes ativadores imitam o efeito das proteínas dependentes de Ca^{+2} para permitir a entrada intracelular desse íon (ALBERTS et al., 2004). Contudo, o tempo da maturação oocitária (idade oocitária) está intrinsicamente envolvido nas respostas aos estímulos de ativação (GORDO et al., 2002). Os agentes ativadores promovem apenas um estímulo de Ca^{+2} , não sendo suficiente para manter os baixos níveis do MPF nos oócitos jovens (LIU et al., 2002). Nesse caso, a meiose é completada, formando a placa da metáfase (MIII) após a extrusão do 2º CP, mas sem ocorrer a formação pronuclear (KUBIAK et al., 1993) Em contraste, os oócitos envelhecidos permitem espontaneamente um decréscimo gradual do MPF, assim como um aumento na sensibilidade oocitária em resposta aos agentes ativadores (WU et al., 1997). No entanto, o desenvolvimento embrionário é comprometido pela idade avançada dos oócitos, devido a degradação do RNAm e de proteínas importantes (GORDO et al., 2002).

Alguns tratamentos associando dois estímulos de ativação são frequentemente utilizados na partenogênese, garantindo melhores resultados no desenvolvimento embrionário dos indivíduos obtidos pela ICSI e transferência nuclear (KEEFER et al.,

2001). A associação é feita com agentes ativadores de Ca^{+2} e com inibidores da síntese proteica ou da fosforilação, para garantir a manutenção do MPF em níveis basais até as primeiras divisões mitóticas (ALBERIO et al., 2001).

Os oócitos ativados partenogeneticamente desenvolvem diferentes formas de ploidia, devido à utilização de diferentes tratamentos de estimulação (MARSHALL; WILTON; MOORE, 1998; MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001). Os partenotos (oócitos ativados partenogeneticamente) haplóides podem ser obtidos por duas formas distintas: quando ocorre a extrusão do 2º CP e a formação de apenas um pronúcleo ou quando o 2º CP não é extruído e o oócito entra em clivagem (BREVINI; GANDOLFI, 2008; PAFFONI et al., 2008). Os partenotos são considerados diplóides quando o 2º CP não é extruído e o oócito forma um ou dois pronúcleos (MARSHALL; WILTON; MOORE, 1998; BREVINI; GANDOLFI, 2008). Para obter esse resultado, os oócitos devem ser incubados com inibidores da polimerização dos filamentos de actina (citocalasina B) para prevenir a extrusão do 2º CP (MITALIPOV et al., 2002; PERECIN et al., 2007). Alternativamente, os partenotos diplóides podem prevenir a extrusão do 1º CP, conduzindo a formação de oócitos triplóides e restabilizar seu estado diplóide no final da maturação com a extrusão do 2º CP (KUBIAK et al., 1991).

2.4.1 Agentes ativadores

Na partenogênese, a redução da atividade do MPF na reconstrução dos oócitos é proporcionada por agentes ativadores que estimulam o aumento de Ca^{+2} intracelular (ALBERIO et al., 2001; BREVINI; GANDOLFI, 2008). Essa ativação pode ser realizada tanto por agentes químicos ou por agentes físicos (PAFFONI et al., 2008). Os agentes químicos mais utilizados na partenogênese são os ionóforos de cálcio (ionomicina e A23187), cloreto de estrôncio (SrCl_2) e o etanol (LIU et al., 2002; RASCADO et al., 2010), e a ativação obtida pelos agentes físicos é realizada por estimulação elétrica (CUI et al., 2009). O SrCl_2 estimula o aumento de Ca^{+2} intracelular pela liberação das reservas citoplasmáticas contidas no RE (LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2002; VARGA et al., 2008). Os ionóforos de cálcio e os impulsos elétricos promovem o influxo de Ca^{+2} do meio extracelular (MARSHALL; WILTON; MOORE, 1998; DE SOUSA et al., 2002). Já o etanol promove os dois efeitos estimuladores

citados anteriormente (MARSHALL; WILTON; MOORE, 1998; RUDDOCK et al., 2000; CHEN et al., 2006).

Os ativadores de Ca^{+2} são comumente associados com inibidores da síntese protéica, como a ciclohexamida (VARGA et al., 2008; ABDALLA et al., 2009), ou com inibidores da fosforilação, como o 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (SUSKO-PARRISH et al., 1994; MISHRA; MISRA; SHARMA, 2008), promovendo altas taxas no desenvolvimento embrionário, devido à manutenção do MPF em nível basal (ALBERIO et al., 2000; LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2002; PAFFONI et al., 2008). No entanto, esses inibidores não atuam especificamente na via metabólica das proteínas reguladoras da maturação oocitária e conseqüentemente podem prejudicar o desenvolvimento embrionário (ALBERIO et al., 2001). Dessa forma, a utilização dos inibidores específicos das CDKs, como a roscovitina (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001; PERECIN et al., 2007), a butirolactona I (LEE et al., 2009) e a bohemina (ALBERIO et al., 2000; PERECIN et al., 2007) promovem melhores resultados quanto à taxa de clivagem e formação de blastocistos (MITALIPOV et al., 2002; PAFFONI et al., 2007; PERECIN et al., 2007).

2.4.1.1 Ionomicina

A ionomicina aumenta a concentração de Ca^{+2} intracelular proveniente das reservas citoplasmáticas do oócito e/ou pelo influxo de Ca^{+2} do meio extracelular (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001; RASCADO et al., 2010), prevenindo a reacumulação do MPF e promovendo a ativação oocitária (SUSKO-PARRISH et al., 1994). No entanto, o preciso mecanismo da liberação de Ca^{+2} intracelular ainda não é bem entendido (RASCADO et al., 2010).

Na espécie *M. mulata*, a ionomicina foi utilizada sozinha na ativação partenogénica promovendo a retomada da meiose, mas sem ocorrer a formação pronuclear (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001).

2.4.1.2 6-DMAP

O 6-DMAP promove a inibição inespecífica da fosforilação do MPF e da MAPK, prevenindo o restabelecimento destas proteínas do seu estado ativo (MARSHALL; WILTON; MOORE, 1998; MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001; MISHRA; MISRA; SHARMA, 2008; VARGA et al., 2008). Essa substância acelera a formação dos pronúcleos, contribui para a desorganização dos microtúbulos e inibe a extrusão do 2º CP, determinando a formação de um embrião diplóide (VITULLO; OZIL, 1992).

Foi descrito em *M. mulata* que oócitos expostos apenas ao 6-DMAP na ativação partenogenética não apresentaram formação pronuclear nem a extrusão do 2º CP (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001). A utilização do 6-DMAP na ativação partenogenética é sempre combinada com estimuladores da oscilação de Ca^{+2} , apresentando melhores taxas na formação de blastocistos (MISHRA; MISRA; SHARMA, 2008; SHEN et al., 2008; SHIRAZI et al., 2009).

Entretanto, tem sido descrito que a inibição inespecífica do 6-DMAP pode ser deletéria ao desenvolvimento do partenoto (MITALIPOV; NUSSER; WOLF, 2001). A grande desvantagem de usar inibidores da fosforilação ou inibidores da síntese proteica é que estes produtos não impedem especificamente a atividade de uma quinase particular ou a síntese de uma proteína específica que controla a progressão do ciclo celular (PERECIN et al., 2007). A inibição da atividade das diversas proteínas quinases, que estão envolvidas em outras funções celulares, pode ter um efeito deletério nos eventos celulares subsequentes após a ativação oocitária (ALBERIO et al., 2001).

2.4.1.3 Roscovitina

A roscovitina pertence à família dos inibidores das CDKs (PERECIN et al., 2007), atuando diretamente como um inibidor competitivo de $p34^{cdc2}$. Os inibidores das CDKs são responsáveis por direcionar o ciclo celular (MEIJER; KIM, 1997), fazendo a redução nos níveis do MPF e prevenindo a ligação de ATP com a sua subunidade $p34^{cdc2}$, sem afetar a atividade das outras proteínas quinases (MEIJER; KIM, 1997). Foi descrito em bovinos que a roscovitina é capaz de inibir tanto a atividade do MPF como da MAPK, quando os oócitos foram cultivados na presença ou não dos fatores de crescimento (VIGNERON et al., 2004).

A roscovitina é bastante utilizada na parada da primeira retomada da meiose nos oócitos bovinos (MERMILLOD et al., 2000; FAERGE et al., 2001) e suínos (KRISCHEK; MEINECKE, 2001; MARCHAL et al., 2001), não afetando o desenvolvimento dos blastocistos. A necessidade do uso destes inibidores para que haja sucesso na ativação partenogenética tem sido sugerida por Perecin et al. (2007). No entanto, o primeiro protocolo de ativação partenogenética em primatas utilizando roscovitina foi o de Mitalipov, Nusser e Wolf (2001), onde foi descrito que os oócitos em MII completaram a meiose após a ativação com ionomicina. Neste trabalho, os oócitos submetidos ao tratamento com ionomicina e roscovitina, extruíram o 2º CP e formaram apenas um pronúcleo, sugerindo que a exposição à roscovitina não interfere na reorganização dos elementos do citoesqueleto durante a segunda divisão meiótica.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Produção embrionária *in vitro* de *Cebus apella* por meio da ativação partenogenética e fecundação de oócitos maturados *in vitro*

Produção embrionária *in vitro* de *Cebus apella* por meio da ativação partenogenética e fecundação de oócitos maturados *in vitro*

Julianne S. Lima^{ab}, Danuza L. Leão^a, Rafael V. Sampaio^c, Moysés S. Miranda^c,
Otávio M. Ohashi^{bc}, Sheyla F. S. Domingues^{ab}

^aLaboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Brasil.

^cLaboratório de Fecundação *In Vitro*, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a maturação oocitária *in vitro* (MIV) na espécie *Cebus apella*, relacionando-a com a expansão das células do *cumulus* e produção *in vitro* de embriões (PIVE), por meio da ativação partenogenética e da fecundação *in vitro* (FIV). Os oócitos puncionados foram classificados em desnudos (OD), com poucas células do *cumulus* (PCC) e complexo *cumulus-oophorus* intacto (CCO intacto). A expansão das células do *cumulus* foi analisada nos tempos de 0, 36 e 40 h de MIV, sendo verificada a maturação dos oócitos após 40 h de MIV. A água de coco em pó (ACP-118[®]) foi utilizada para diluição e posterior resfriamento do sêmen para ser empregado na FIV. Para a ativação partenogenética foi utilizado ionomicina em associação com 6-DMAP ou roscovitina. Em 40 h de MIV, apenas os CCO intactos alcançaram o nível máximo de expansão das células do *cumulus* (87%). A competência meiótica, verificada pela extrusão do 1º corpúsculo polar foi alcançada somente pelos CCO intactos e PCC. O protocolo utilizando ionomicina/6-DMAP e da FIV produziram as primeiras divisões embrionárias (4 células). Os resultados encontrados neste trabalho indicaram que a expansão total das células do *cumulus* está relacionada com a completa maturação dos oócitos, sendo descrito pela primeira vez a produção *in vitro* na espécie *C. apella*.

Palavras-chave: *C. apella*, MIV, ativação partenogenética, FIV.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) por meio da fecundação *in vitro* (FIV) é considerada uma ferramenta bem estabilizada para se avaliar a competência oocitária *in vitro*. A FIV, entretanto, depende da viabilidade dos espermatozoides (1). Com relação à espécie *Cebus apella*, a capacitação *in vitro* dos espermatozoides é diferenciada devido ao sêmen ser formado por um coágulo seminal de difícil dissolução (2). Apesar da recuperação de espermatozoides viáveis em *C. apella* já ter sido obtida após a diluição do coágulo em solução à base de água de coco (3), isso não garante a eficácia dos espermatozoides em fecundar os oócitos *in vitro*. Quando se pretende desenvolver embriões *in vitro* sem a interferência paterna, a ativação partenogenética pode ser empregada (4). Esta biotécnica é considerada como uma excelente opção para se avaliar a qualidade oocitária (5). A ativação partenogenética é realizada artificialmente nos mamíferos, por meio da utilização de agentes ativadores como a ionomicina associada com inibidores proteicos (6-DMAP ou roscovitina) (4). Foi realizado na espécie *C. apella* um protocolo de coleta e maturação oocitária em fêmeas não estimuladas hormonalmente, analisando a competência meiótica em 36 h de maturação oocitária *in vitro* (MIV) (6). No entanto, a habilidade da MIV, assim como da fecundação *in vitro* ou da formação de partenotos não foram avaliados. Diante disso, o objetivo deste trabalho é analisar a maturação oocitária, avaliando se os oócitos estão competentes para produzir embriões *in vitro*, a partir da FIV, utilizando sêmen resfriado e pela ativação partenogenética com o emprego de ionomicina associada com 6-DMAP e roscovitina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Evandro Chagas (Protocolo CEPAN – N° 0045/2008). Seis fêmeas (n=6) e três machos (n=3) da espécie *C. apella* foram selecionados para o experimento após a confirmação do bom estado de saúde e da maturidade sexual. A dieta diária consistia de produtos hortifrutigranjeiros e ração peletizada (Megazoo P18 - Primatas, Megazoo, Betim, MG, Brasil). Os animais foram mantidos dentro de gaiolas individuais de alumínio com fundo retrátil (dimensões 80x90x80 cm), em galpões telados pertencentes do Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, Pará, Brasil.

Coleta de oócitos e Maturação oocitária *in vitro* (MIV)

Os meios utilizados neste trabalho foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Por volta do 7º ao 11º dia do ciclo menstrual, quando o folículo pré-ovulatório alcança aproximadamente 9 mm de diâmetro (avaliados por ultrassonografia) todos os folículos antrais foram puncionados por laparotomia (6). Os oócitos coletados foram acondicionados no fluido folicular e solução fisiológica, em um tempo máximo de 2 h, em virtude do transporte para o laboratório. Posteriormente, os mesmos foram lavados em TCM 199 com Hepes (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, USA) e divididos em diferentes grupos para maturação *in vitro*, de acordo com critérios da quantidade de células do *cumulus*: oócitos sem células do *cumulus* (desnudos); CCO com poucas células do *cumulus* (PCC); CCO apresentando várias camadas de células do *cumulus* (CCO intacto).

Os oócitos foram cultivados *in vitro* em meio de maturação contendo TCM 199, suplementado com 50 µg/mL LH (Bioniche Animal Health, Belleville, Canada), 0,5 µg/mL hFSH (Bioniche Animal Health), 0,5 mg/mL de Fator de Crescimento Epidermal (EGF), 0,22 mM de piruvato, 50 mM de β-mercaptoethanol, e 10% de soro fetal bovino (GIBCO/Invitrogen). Os oócitos foram cultivados *in vitro* por 40 h em gotas de 100 µl de meio, sob óleo mineral, mantidos a 38,5 ° C em estufa de 5 % de CO₂.

Avaliação da expansão das células do *cumulus*

A expansão das células do *cumulus* foi avaliada subjetivamente em três tempos distintos: imediato à submissão ao cultivo *in vitro* (T0), após 36 (T36) e 40 h (T40) de MIV. A classificação da expansão foi realizada segundo as categorias descritas por Zheng et al. (7): 0 - sem expansão; 1 - resposta observável mínima, com separação somente das camadas mais externas das células do *cumulus*; 2 - expansão da metade das camadas externas dos CCOs; 3 - expansão de todas as camadas de CCOs, exceto a corona radiata; e 4 - expansão total, incluindo todas as camadas dos CCOs, incluindo a corona radiata.

Coleta, preparação do sêmen e FIV

A coleta do sêmen, a expansão e a liquefação do coágulo seminal foi realizada segundo Oliveira et al. (3), aplicando a água de coco em pó (ACP[®] 118, Biotecnologia, CE, Brasil) como diluidor. Após a liquefação do coágulo seminal, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas plásticas de 0,25 mL (Minitüb, Tiefenbach, Germany) e

posteriormente foram resfriadas utilizando uma curva decrescente de temperatura de 36 °C para 4 °C (4 °C/min), permanecendo em geladeira à 4 °C até o momento da FIV. Para separar os espermatozóides do coágulo seminal liquefeito e do diluente, foi utilizado o método de swim-up. A FIV ocorreu com a adição de 5 µL de sêmen (5×10^6 spz/mL) para a gota de 80 µL de meio FIV (Fert-TALP) contendo 10 oócitos. A incubação dos gametas ocorreu por 30 h em estufa a 5% CO₂ a 38,5 °C.

Ativação partenogenética

Os oócitos foram desnudados com 0,5 µg/mL de hialuronidase para constatar a maturação (presença do 1º CP) após 40 h de MIV. Os oócitos maturados foram ativados com 5 µM de ionomicina por 5 min em meio TALP/Hepes, suplementado com 1 mg/ml de BSA, posteriormente os oócitos foram lavados em meio TALP/Hepes, suplementado com 30 mg/mL de BSA por 3 min. Após a exposição com ionomicina, os oócitos foram transferidos para o meio SOF (Sintetic Oviduct Fluid) contendo 2 mM de 6- DMAP ou contendo 50 µM de roscovitina e cultivados em estufa a 38,5 °C e 5% de CO₂ por 3 h.

Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro*, após a FIV e a ativação partenogenética, foi realizado em um sistema de co-cultivo dos embriões em monocamada de células do *cumulus*, utilizando meio SOF, suplementado com 6 mg/mL de BSA, 10% de SFB e antibióticos, a 38,5 °C e acondicionados em estufa a 5% CO₂ por sete dias. A avaliação da extrusão do 2º CP e da formação pronuclear foi monitorada por exame microscópico realizada após 24 h de cultivo *in vitro*. A análise do desenvolvimento embrionário ocorreu pela marcação com 1 mg/mL de fluorocromo Hoechst 33342 por 15 min, sob microscopia de fluorescência em até 7 dias de cultivo *in vitro*.

Análise estatística

Os dados foram expressos pela média ± erro padrão da média (EPM). O efeito da expansão das células do *cumulus* dos oócitos foi analisado pelo teste Whitney-Mann (Software Statview - SAS Institute Inc, Cary, NC). Os dados foram analisados pela ANOVA, considerando P<0,05 estatisticamente significante.

RESULTADOS

O total de 67 oócitos foram puncionados de 14 ovários (4-5 oócitos/fêmeas), o qual 14 estavam desnudos, 24 estavam parcialmente intactos (PCC) e 29 estavam intactos (Figura 1a). Apesar de 100% dos CCO intactos e 67% dos PCC alcançarem a MII (Tabela 1; Figura 2a), somente os CCO intactos apresentaram expansão completa das células do *cumulus* ($87 \pm 8 \%$), dos quais PCC permaneceram no grau II ($67 \pm 14 \%$) e III ($23 \pm 10 \%$) de expansão das células do *cumulus* (Tabela 2; Figura 1b). O sêmen coletado apresentou 80% de motilidade e vigor 4 após a diluição em ACP-118[®] e resfriamento por 6 h a 4 °C. A capacitação espermática ocorreu em 30 min. O tratamento com ionomicina/roscovitina formou somente zigotos haplóides, sem a observação de clivagem (Figura 2b) e o tratamento com ionomicina/6-DMAP formou zigotos diplóides (Figura 2c). Partenotos que entraram em clivagem foram obtidos somente quando foram ativados com ionomicina/6-DMAP. Após 30 h de FIV, a extrusão do 2º CP foi observada em 40% dos oócitos e 20% formaram zigotos, com clivagem em 4 células (Tabela 3; Figura 2d).

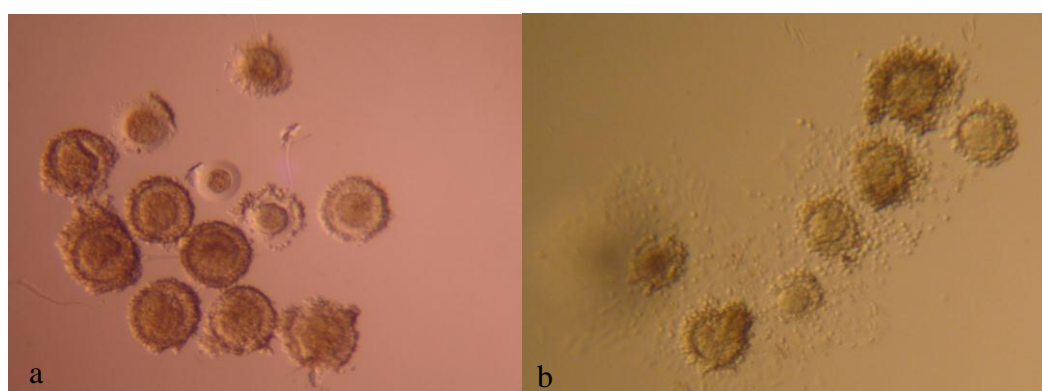


Figura 1: Oócitos obtidos de folículos antrais de *C. apella*; **a)** Morfologia dos oócitos, mostrando oócitos desnudos (OD), poucas células do *cumulus* (PCC) e oócitos intactos (CCO intacto); **b)** expansão das células do *cumulus* após a MIV de 40 h. (400x).

Tabela 1: Percentual de oócitos desnudos (OD), com poucas células do *cumulus* (PCC) e oócitos intactos (CCO intacto) competentes meioticamente (MII) em *C. apella* após 40 h de cultivo *in vitro*.

Oócitos	Nº of oócitos	MII (Média % EPM)
OD	14	0 ± 0^a
PCC	24	67 ± 24^b
CCO intacto	29	100 ± 0^b

^{a-b} Letras diferentes dentro da mesma coluna diferem significativamente. (Kruskal-Wallis). ($p < 0,05$).

Tabela 2: Efeito da expansão das células do *cumulus* dos oócitos intactos (CCO intacto) e com poucas células do *cumulus* (PCC) em dois diferentes tempos de cultivo *in vitro*: 36 e 40 h.

Classificação Oocitária	MIV	Expansão do <i>cumulus</i>				
		(M ± EPM)				
		0	I	II	III	IV
PCC	0 h	67 ± 14 ^{aA*}	26 ± 14 ^{aB}	7 ± 7 ^{Ab}	0 ^{aB*}	0 ^{aB}
	36 h	0 ^{Aa}	86 ± 9 ^{aB*}	7 ± 7 ^{aA}	7 ± 7 ^{aA}	0 ^{aA}
	40 h	0 ^{aA}	13 ± 8 ^{aA}	64 ± 15 ^{aB*}	23 ± 10 ^{aC}	0 ^{aA}
CCO intactos	0 h	55 ± 11 ^{aA*}	38 ± 13 ^{aA}	7 ± 7 ^{aB}	0 ^{aB}	0 ^{aB}
	36 h	0 ^{aA}	67 ± 21 ^{aB}	0 ^{aA}	8 ± 8 ^{aA}	25 ± 17 ^{bAB}
	40 h	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{bA}	13 ± 8 ^{aB}	87 ± 8 ^{bAB*}

^{a-b} Diferença entre oócitos com poucas células do *cumulus* (PCC) e oócitos com células do *cumulus* intactos (CCO intacto), dentro de uma mesma classificação oocitária (Teste Whitney-Mann) e mesmo tempo de cultivo ($p < 0,05$).

^{A-C} Diferença entre expansão das células do *cumulus* (I, II, III, IV) em uma mesma classificação oocitária, dentro de um mesmo tempo de cultivo (Kruskal-Wallis). ($p < 0,05$).

* Valores diferentes entre 0, 36 e 40 h de cultivo (Kruskal-Wallis), na mesma categoria de expansão do *cumulus* e classificação oocitária ($p < 0,05$).

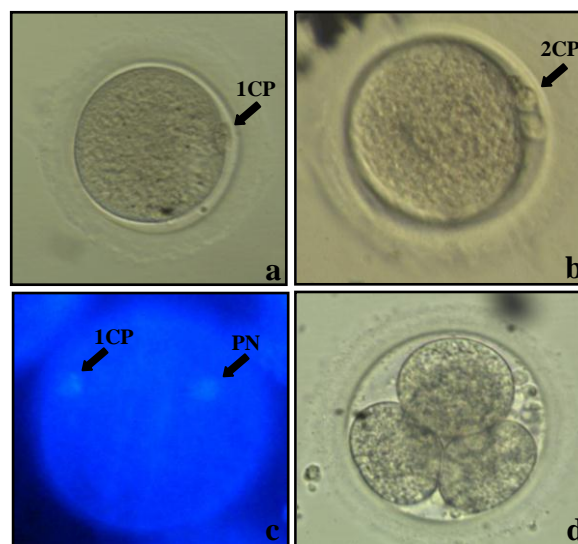


Figura 2: a) Oócito maturado (MII) de *C. apella*, notar a presença do 1º corpúsculo polar (1CP); b) partenotos ativado com ionomicina em combinação com roscovitina, notar a extrusão do 2º corpúsculo polar (2CP); c) microscopia fluorescente do partenoto diplóide de *C. apella* ativado com ionomicina em combinação com 6-DMAP, mostrando o 1ºCP e formação pronuclear (PN); d) Embrião de *C. apella* obtido pela FIV. (400x).

Tabela 3: Extrusão do 2º corpúsculo polar (2CP), formação pronuclear (1 ou mais) e clivagem derivada da fecundação *in vitro* e ativação partenogenética com a exposição a ionomicina em combinação com 6-DMAP ou roscovitina.

Tratamento	Nº de oócitos	Extrusão do 2º CP (média% EPM)	Formação pronuclear (média% EPM)	Clivagem (média% EPM)
F IV	10	40 ± 16 ^a	40 ± 16	20 ± 13
I*/6-DMAP	20	0 ^b	20 ± 9	10 ± 6
I/Roscovitina	12	8 ± 8 ^b	25 ± 13	0

Ionomicina

^{a, b} ANOVA (p < 0,05)

DISCUSSÃO

Este trabalho foi o primeiro a descrever a produção *in vitro* de embriões na espécie *C. apella*. Vale ressaltar que o sistema desenvolvido neste trabalho de coleta e maturação oocitária sem a adição de estímulos hormonais nas fêmeas, possibilitou a aquisição da competência meiótica dos oócitos após a MIV e o posterior desenvolvimento embrionário. A maioria dos estudos descrevendo a PIVE nos primatas realiza a maturação dos oócitos com a ajuda de tratamentos hormonais (maturação *in vivo*) (8-9). O efeito da qualidade das células do *cumulus* na MIV foi positivamente relacionado com a competência meiótica (MII). Após 40 h de cultivo, somente os CCO intactos promoveram a expansão total das células do *cumulus* (classe IV), essa diferença foi significativamente mais elevada do que os PCC (67%), os quais tiveram um menor alcance da MII em relação aos CCO intactos (100%). Foi obtido por Domingues et al. (6) a média de 55% de MII após 36 h de MIV. Entretanto, os oócitos de *M. mulatta* alcançaram a MII independentes da expansão do *cumulus* (7). A completa expansão do *cumulus* interfere na competência meiótica dos oócitos de *C. apella*. Essa discrepância pode refletir diferenças espécies-específicas no mecanismo de expansão do *cumulus*.

O coágulo de *C. apella* possui uma alta concentração espermática, bem maior que a fração líquida (3). Nós obtemos espermatozóides viáveis a partir de sêmen diluído e resfriado em ACP-118[®]. Esse diluidor foi capaz de manter a integridade espermática e a capacidade de fecundar em até 6 h. O resfriamento parece não ter afetado a qualidade espermática devido à conservação de energia dos espermatozóides até o momento da FIV. Segundo Amann & Hammerstedt (10), a congelação altera a superfície da

membrana dos espermatozóides, podendo afetar a estabilidade da membrana ou induzir um rearranjo das moléculas lipídicas formando pontos de fragilidade, promovendo uma permeabilidade excessiva ou até mesmo a ruptura da membrana. Em primatas, a FIV é realizada na sua grande maioria com sêmen fresco, devido o espermatozóides congelados perderem rapidamente a sua motilidade (11).

Os oócitos fecundados *in vitro* sugerem que a competência embrionária não é comprometida pela exposição química (ativação partenogenética). O protocolo de PIVE desenvolvido na espécie *C. apella* promoveu o início do desenvolvimento embrionário (clivagem), nos grupos submetidos à FIV e à ativação com ionomicina/6-DMAP. Nos primatas, o uso de 6-DMAP resultou em uma melhor taxa de produção embrionária do que os inibidores específicos de MPF, como a roscovitina (8). Protocolos de ativação partenogenética que produzem partenotos haplóides (roscovitina), podem prejudicar os estágios iniciais da clivagem em vez dos protocolos que causam condições diplóides (6-DMAP) nos partenotos (4). A parada no desenvolvimento embrionário ocorreu nas primeiras divisões da clivagem (4-células), similar ao que foi observado anteriormente em *Callithrix jacchus*, tratados com ionomicina/6-DMAP (9). Entretanto, quando a espécie *Macaca mulata* foi submetida ao tratamento com ionomicina/6-DMAP formaram blastocistos numa taxa similar aos dos embriões produzidos pela ICSI (8). A eficiência embrionária pode ser profundamente afetada pelas condições de cultivo *in vitro*, influenciando no subsequente desenvolvimento dos embriões (7). No geral, os melhores resultados encontrados nesse estudo ocorreram na FIV, sendo sugerido que a ativação partenogenética causa falhas no desenvolvimento dos partenotos devido à ausência do genoma parterno (4), assim apoiado por outros trabalhos com resultados semelhantes (8-9). Neste trabalho foi obtido oócitos maturados *in vitro* de *C. apella* que são capazes de fecundar *in vitro* e produzir partenotos quando expostos à ionomicina/6-DMAP. Comparações entre os tratamentos deste trabalho nos permite investigar os efeitos do desenvolvimento folicular e oocitário na competência meiótica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Nacional de Primatas e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Zheng P. Effects of *in vitro* maturation of monkey oocytes on their developmental capacity. *Anim Reprod Sci* 2007; 98: 56-71.
2. Dixson AF, Anderson MJ. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in Primates. *Folia Primatol* 2002; 73: 63-9.
3. Oliveira KG, Miranda SA, Leão DL, Brito AB, Santos RR, Domingues SFS. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Anim Reprod Sci* 2011; 123: n. 1-2, 75-80.
4. Paffoni A, Brevini TAL, Gandolfi F, Ragni G. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART Laboratory. *Placenta* 2008; 29: 121-5.
5. Varga E, Pataki R, Lórinicz Z, Koltai J, Papp AB. Parthenogenetic development of *in vitro* matured porcine oocytes treated with chemical agents. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 226-233.
6. Domingues SFS, Caldas-Bussiere MC, Petretski MDA, Ohashi OM, Lima JS, Santos RR, Cordeiro MS, Castro PHG. Effects of follicular phase and oocyte–cumulus complexes quality on the protein profile and *in vitro* oocyte meiosis competence in *Cebus apella*. *Fertil Steril* 2010; 93: 1662-7.
7. Zheng P, Wang H, Bavister BD, Ji W. Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined culture media and their functional assessment by IVF and embryo development. *Human Reprod* 2001; 16: 300-305.
8. Mitalipov SM, Nusser KD, Wolf DP. Parthenogenetic activation of Rhesus monkey oocytes and reconstructed Embryos. *Biol Reprod* 2001; 65:253-9.
9. Grupen CG, Gilchrist RB, Nayudu PL, Barry MF, Schulz SJ, Ritter LJ, Armstrong DT. Effects of ovarian stimulation, with and without human chorionic gonadotrophin, on oocyte meiotic and developmental competence in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology* 2007; 68: 861-872.
10. Amann RP, Hammerstedt RH. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J. androl*; 1993; 14: n. 6, 397-406.
11. Wolf DP, Thormahlen S, Ramsey C, Yeoman RR, Fanton J, Mitalipov S. Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. *Biol reprod* 2004; 71: 486-493.

4 CONCLUSÃO

A expansão das células do *cumulus* pode ser relacionada com a competência oocitária na espécie *C. apella*. Visto que, a expansão total das células do *cumulus* coincidiu com os oócitos que alcançaram a MII.

A produção *in vitro* de embriões em *C. apella* foi alcançada pelas metodologias aplicadas neste trabalho. No entanto, mais estudos são necessários para promover um melhor desenvolvimento embrionário *in vitro* nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, H. et al. A combined treatment of ionomycin with ethanol improves blastocyst development of bovine oocytes harvested from stored ovaries and microinjected with spermatozoa. **Theriogenology**, v. 72, p. 453-460. 2009.
- ACHARYA, U. et al. Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. **Cell**, v. 92, p. 183-192. 1998.
- ALAK, B.M.; WOLF, D.P. Rhesus monkey oocyte maturation and fertilization *in vitro*: roles of the menstrual cycle phase and of exogenous gonadotropins. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 879-887. 1994.
- ALBERIO, R. et al. Activation of Bovine Oocytes by Specific Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 422-432. 2000.
- ALBERIO, R. et al. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. **International Journal of Developmental Biology**, v. 45, p. 797-809. 2001.
- ALBERTINI, D.F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647-653. 2001.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ALI, A. et al. The potential role of gap junction communication between *cumulus* cells and bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 358-367. 2005.
- ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 223-243. 2007.

ARAÚJO, L.L. et al. Uso de solução à base de água de coco a 37 °C como diluidor de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 588-594, abr./jun. 2009.

ASAKAWA, W.; DUKELOW, R. Chromosomal analyses after *in vitro* fertilization of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 26, p. 579-583. 1982.

ASSOU, S. et al. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. **Human Reproduction**, v. 21, n. 7, p. 1705–1719. 2006.

AVERY, B. et al. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 334-344. 1998.

BAVISTER, B.D. et al. Fertilization and Cleavage of Rhesus Monkey Oocytes *In Vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 983-999. 1983.

BAVISTER, B.D. ARTs in action in nonhuman primates: Symposium summary – advances and remaining issues. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 43. 2004.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p. 54-62. 1995.

BREVINI, T.A.L.; GANDOLFI, F. Parthenotes as a source of embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 1, p. 20-30. 2008.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 543-547. 1990.

BUSH, D.F. et al. Semen evaluation in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Laboratory Animal Science**, v. 25, n. 5, p. 588-593. 1975.

CAMPBELL, K.H.S. et al. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 40-46. 1996.

CHEN, N. et al. Early development of reconstructed embryos after somatic cell nuclear transfer in a non-human primate. **Theriogenology**, v. 66, p. 1300-1306. 2006.

CHEN, N. et al. Somatic cell nuclear transfer using transported in vitro-matured oocytes in cynomolgus monkey. **Zygote**, v. 15, p.25-33. 2007.

CIBELLI, J.B. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v. 280, p. 1256. 1998.

COMBELLES, C.M.H. et al. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system. **Human reproduction**, v. 20, n. 5, p. 1349-1358. 2005.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, E. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40, p. 493-504. 2000.

COTICCHIO, G. et al. What Criteria for the Definition of Oocyte Quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1034, p. 132-144. 2004.

CUI, M.S. et al. Porcine cumulus cell influences ooplasmic mitochondria–lipid distributions, GSH–ATP contents and calcium release pattern after electro-activation. **Theriogenology**, v. 71, p. 412-421. 2009.

CURNOW, E.C. et al. Oocyte glutathione and fertilisation outcome of *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis* in *in vivo*- and *in vitro*-matured oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1032-1040. 2010a.

CURNOW, E.C. et al. In vitro developmental potential of macaque oocytes, derived from unstimulated ovaries, following maturation in the presence of glutathione ethyl ester. **Human Reproduction**, v. 25, n. 10, p. 2465-2474, 2010b.

DE PRADA, J.K. et al. Role for cumulus cell-produced EGF-like ligands during primate oocyte maturation in vitro. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p. E1049-E1058. 2009.

DE SOUSA, P.A. et al. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 642-650. 2002.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**, 1: 82-88. 1996.

DELIMITREVA, S. et al. Meiotic abnormalities in *in vitro*-matured marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocytes: development of a non-human primate model to investigate causal factors. **Human Reproduction**, v. 21, n. 1, p. 240-247. 2006.

DELL'AQUILA, M.E. et al. *Cumulus* expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine *cumulus*-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 44. 2004.

DIXSON, A.F.; ANDERSON, M.J. Sexual selection and the comparative anatomy of reproduction in monkeys, apes, and human beings. **Annual Review of Sex Research**, v. 12, p. 121-144. 2001.

DIXSON, A.F.; ANDERSON, M.J. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. **Folia Primatologica**, v. 73, p. 63-69. 2002.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral follicles. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 301-308. 2003.

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 57-71. 2006.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). **Theriogenology**, v. 68, p. 1251-1259. 2007.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Effects of follicular phase and oocyte-cumulus complexes quality on the protein profile and in vitro oocyte meiosis competence in *Cebus apella*. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 5, p. 1662-1667. 2010.

DOWNS, S.M. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 371-379. 1989.

DUCCIBELLA, T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 1, p. 29-42. 1996.

DUCIBELLA, T. et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. **Developmental Biology**, v. 250, p. 280-291. 2002.

DURRANT, B.S. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). **Theriogenology**, v. 71, p. 113-122. 2009.

FAERGE, I. et al. Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 459-467. 2001.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216. 2003.

FAN, H.; SUN, G. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 535-547. 2004.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848. 2009.

FERRELL Jr., J.E. Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. **BioEssays**, v. 21, p. 833-842. 1999.

FISSORE, R.A. et al. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v. 124, p. 745-754. 2002.

FLORMAN, H.M.; DUCIBELLA, T. Fertilization in Mammals. In: NEILL, J.D. **Physiology of Reproduction**. 3. ed. San Diego: Elsevier Press, 2006. p. 55-112.

FRAGASZY, D.M.; ADAMS-CURTIS, L.E. Growth and reproduction in captive tufted capuchins (*Cebus apella*). **American Journal of Primatology**, v. 44, n. 3, p. 197-203. 1998.

GALLI, C. et al. Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. **Theriogenology**, v. 58, p. 705-708. 2002.

GILCHRIST, R.B.; NAYUDU, P.L.; HODGES, J.K. Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes *in vitro*. **Biology of reproduction**, v.56, p. 238-246. 1997.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-446. 2004.

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

GLOTZER, M.; MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. **Nature**, v. 349, p.132-138. 1991.

GORDO, A.C. et al. Intracellular Calcium Oscillations Signal Apoptosis Rather than Activation in In Vitro Aged Mouse Eggs. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1828-1837. 2002.

GOTO, K. et al. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. **Veterinary Record**, v. 127, p. 517-20. 1990.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Gap Junctions in the Ovaries. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 947-957. 1997.

GRØNDAHL, C. Oocyte maturation: Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. **Danish Medical Bulletin**, v. 55, n. 1/Feb, p. 1-16. 2008.

GRUPEN, C.G. et al. Effects of ovarian stimulation, with and without human chorionic gonadotrophin, on oocyte meiotic and developmental competence in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Theriogenology**, v. 68, p. 861-872. 2007.

HARROU, K.W.; CLARKE, H.J. Mitogen-activated protein (MAP) kinase during the acquisition of meiotic competence by growing oocytes of the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p. 29-36. 1995.

HEARN, J. New word primates for research in human reproduction health. **American Journal of Primatology**, v. 34, p. 11-17. 1994.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. et al. Artificial insemination in black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). **Theriogenology**, v. 67, p. 399-406. 2007.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. et al. Seasonal emission of seminal coagulum and *in vivo* sperm dynamics in the Black-handed Spider Monkey (*Ateles geoffroyi*).

Theriogenology, v. 69, p. 466-472. 2008.

HEWITSON, L.C. et al. Microtubule and chromatin configurations during rhesus intracytoplasmic sperm injection: Successes and failures. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 271-280. 1996.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle.

Theriogenology, v. 47, p. 28-32. 1997.

IKEDA, S. et al. Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the development competence of bovine oocytes during *in vitro* maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects. **Reproduction**, v. 132, p. 5549-5557. 2006.

JIMENEZ-MACEDO, A.R. et al. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes.

Theriogenology, v. 65, p. 1769-1782. 2006.

JUREMA, M.W.; NOGUEIRA, D. *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 5, p. 1277-1291. 2006.

KA, H.H. et al. Amino acids in maturation medium and presence of *cumulus* cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1478-1483. 1997.

KEEFER, C.L. et al. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 849-856. 2001.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis.

Reproduction, v. 123, p. 613-620. 2002.

KING, R.W. et al. How proteolysis drives the cell cycle. **Science**, v. 274, p. 1652-1659. 1996.

KOTANI, T.; YAMASHITA, M. Discrimination of the roles of MPF and MAP Kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. **Developmental Biology**, v. 252, p. 271-286. 2002.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. Roscovitine, a specific inhibitor of cyclin-dependent protein kinases, reversibly inhibits chromatin condensation during *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Zygote**, v. 9, p. 309-316. 2001.

KUBIAK, J.Z. et al. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. **Development**, v. 111, p. 763-770. 1991.

KUBIAK, J.Z. et al. The metaphase arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. **The Embo Journal**, v. 12, p. 3773-3778. 1993.

KUBISCH, H.M. et al. *In vitro* fertilization in the pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). **Theriogenology**, v. 66, p. 749-754. 2006.

KUEHL, T.J.; DUKELOW, W.R. Maturation and *in vitro* fertilization of follicular oocytes of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 545-556. 1979.

KURETAKE, S. et al. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 789-795. 1996.

LEE, B.; YOON, S.Y.; FISSORE, R.A. Regulation of fertilization-initiated [Ca²⁺] oscillations in mammalian eggs: A multi-pronged approach. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 17, p. 274-284. 2006.

- LEE, K. et al. Incidence of apoptosis in parthenogenetic porcine embryos generated by using protein kinase or protein synthesis inhibitors. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 261-272. 2009.
- LI, Y. et al. Effect of Amino Acids on Cryopreservation of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Sperm. **American Journal of Primatology**, v. 59, p. 159-165. 2003.
- LINN, G.S. et al. Social and menstrual cycle phase influence on the behavior of group – housed *Cebus apella*. **American Journal of Primatology**, v. 35, p. 41-57. 1995.
- LIU, L.; YANG, X. Interplay of Maturation-Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1-7. 1999.
- LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 204-210. 2002.
- LOHKA, M.J.; HAYES, M.K.; MALLER, J.L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. **Cell Biology**, v. 85, p. 3009-3013, may. 1988.
- LORCA, T. et al. Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. **The Embo Journal**, v. 11, n. 7, p. 2381-2390. 1992.
- MAHMUDI, R. et al. Cumulus cell role on mouse germinal vesicle oocyte maturation, fertilization, and subsequent embryo development to blastocyst stage in vitro. **Yakhteh Medical Journal**, v. 11, n. 3, p. 299-302. 2009.
- MARCHAL, R. et al. Effects of cell cycle dependent kinases inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 65-73. 2001.

MARCHAL, R. et al. Effect of Growth Hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1013-1022. 2003.

MARSHALL, V.S.; WILTON, L.J.; MOORE, H.D.M. parthenogenetic activation of marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of marmoset parthenogenones *in vitro* and *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1491-1497. 1998.

MARTINS, C.F.; SILVA, A.E.D.F.; RUMPF, R. **Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução dos bovinos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 39 p. (Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 84).

MASUI, Y.; MARKET, C.L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 77, p. 129-146. 1971.

MEIJER, L.; KIM, S.H. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Methods Enzymol**, v. 283, p. 113-28. 1997.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, p. 791-799. 2005.

MENG, L.; WOLF, D.P. Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.12, n.5, p. 1062-1068. 1997.

MERMILLOD, P. et al. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the vesicle stage for 24 h in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 89-95. 2000.

MISHRA, V.; MISRA, A.K.; SHARMA, R. A comparative study of parthenogenic activation and *in vitro* fertilization of bubaline oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 249–259. 2008.

MITALIPOV, S.M.; NUSSER, K.D.; WOLF, D.P. Parthenogenetic Activation of Rhesus Monkey Oocytes and Reconstructed Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 253-259. 2001.

MITALIPOV, S.M. et al. Rhesus Monkey Embryos Produced by Nuclear Transfer from Embryonic Blastomeres or Somatic Cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1367-1373. 2002.

MORGAN, P.M.; BOATMAN, D.E.; BAVISTER, B.D. In vitro maturation of ovarian oocytes from unstimulated rhesus monkeys: assessment of cytoplasmic maturity by embryonic development after in vitro fertilization **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 89-93. 1991.

MORRELL, J.M.; HODGES, J.K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. **Animal Reproduction Science**, v. 53, p. 43-63. 1998.

MORRELL, J.M. et al. Artificial insemination in *Callithrix jacchus* using fresh or cryopreserved sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 52, p. 165-174. 1998.

MOTLIK, J.; FULKA, J.; FLÉCHON, J.E. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and *cumulus* cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 31-37. 1986.

NG, S.C. et al. Intracytoplasmic injection of frozen-thawed epididymal spermatozoa in a nonhuman primate model, the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **Theriogenology**, v. 58, p. 1385-1397. 2002.

NAGLE, C.A. et al. The plasma pattern of ovarian steroids during the menstrual cycle in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 979-983. 1979.

NAGLE, C.A. et al. Temporal relationship between follicular development, ovulation and hormonal profile in the capuchin monkey (*Cebus apella*). **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 629-635. 1980.

NAGLE, C.A.; DENARI, J.H. The Cebus Monkey (*Cebus apella*). In: HEARN, J.P. **Reproduction in New World Primates**. Boston: MT Press, Lancaster, 1983, p. 41-67.

NANASSY, L. et al. Changes in MPF and MAPK activities in porcine oocytes activated by different methods. **Theriogenology**, v. 68, p. 146-152. 2007.

NUSSER, K.D. et al. Development competence of oocytes after ICSI in the rhesus monkey. **Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 130-137. 2001.

OLIVEIRA, K.G. et al. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118[®]), em diferentes temperaturas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 4, n. 3, p. 617-621, mar. 2010.

OLIVEIRA, K.G. et al. Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 1-2, p. 75-80. 2011.

ORTIZ, R.E. et al. Cytologic, hormonal, and ultrasonographic correlates of the menstrual cycle of the new world monkey *Cebus apella*. **American Journal of Primatology**, v. 66, p. 233-244. 2005.

PAFFONI, A. et al. In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 1, p. 77-82. 2007.

PAFFONI, A. et al. Parthenogenetic Activation: Biology and Applications in the ART Laboratory. **Placenta**, v. 29, p. 121-125. 2008.

PALERMO, G.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, v. 340, p. 17-18. 1992.

PARRISH, J.J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180. 1988.

PERECIN, F. et al. Oocyte activation and preimplantation development of bovine embryos obtained by specific inhibition of cyclin-dependent kinases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 280-287. 2007.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 27-37. 1998.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and *in vitro* I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 665-675. 1935.

POPE, C.E.; POPE, V.Z.; BECK, L.R. Development of baboon preimplantation embryos to post-implantation stages in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 915-923. 1982.

RASCADO, T.S. et al. Parthenogenetic development of domestic cat oocytes treated with ionomycin, cycloheximide, roscovitina and strontium. **Theriogenology**, v. 74, p. 596-601. 2010.

ROUSSEL, J.D.; AUSTIN, C.R. Preservation of primate spermatozoa by freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.13, p. 333-335. 1967.

RUDDOCK, N.T. et al. Mechanism of intracellular pH increase during parthenogenetic activation of in vitro matured porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 488-492. 2000.

- SANKAI, T. et al. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 273-278. 1994.
- SCHNIEKE, A.E. et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, p. 2130-2133. 1997.
- SCHRAMM, R.D.; BAVISTER, B.D. Follicle-stimulating hormone priming of rhesus monkeys enhances meiotic and developmental competence of oocytes matured in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 904-912. 1994.
- SCHRAMM, R.D.; BAVISTER, B.D. A macaque model for studying mechanisms controlling oocyte development and maturation in human and non-human primates. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2544-2555. 1999.
- SCHRAMM, R.D.; PAPROCKI, A.M. Birth of rhesus monkey infant after transfer of embryos derived from in vitro matured oocytes. **Human Reproduction**, v. 15, p. 2411-2414. 2000.
- SCHRAMM, R.D.; PAPROCKI, A.M.; VANDEVOORT, C.A. Causes of developmental failure of in-vitro matured rhesus monkey oocytes: impairments in embryonic genome activation. **Human Reproduction**, v. 18, n.4, p. 826-833. 2003
- SCHRAMM, R.D. et al. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated rhesus monkeys. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 349-356. 1993.
- SETTLAGE, D.S.F.; SWAN, S.; HENDRICKX, A.G. Comparison of artificial insemination with natural mating technique in rhesus monkey, *Macaca mulatta*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 129-32. 1973.
- SHEN, P.C. et al. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 1-12. 2008.

SHIMOZAWA, N. et al. Comparison of methods to stimulate ovarian follicular growth in cynomolgus and African green monkeys for collection of mature oocytes.

Theriogenology, v. 67, p. 1143-1149. 2007.

SHIRAZI, A. et al. *In vitro* developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 342-348. 2009.

SUN, Q.Y. et al. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 192-198. 2001.

SUN, Q. et al. Efficient reproduction of cynomolgus monkey using pronuclear embryo transfer technique. **PNAS**, v. 105, n. 35, Sep 2, p. 12956-12960. 2008.

SUSKO-PARRISH, J.L. et al. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Developmental Biology**, v. 166, n. 2, p. 729-739. 1994.

SUZUKI, H.; JEONG, B.S.; YANG, X. Dynamic changes of *cumulus*-oocyte cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 63, p. 723-729. 2000.

TANGHE, S. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 3, p. 414-424. 2002.

TAO, Y. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. **Zygote**, v. 13, p. 1-9. 2005.

TESTART, J. et al. Study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. II. Influence of semen quality and oocyte maturity on fertilization and cleavage. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 425-431. 1983.

TOLLNER, T.L. et al. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v, 90, p. 347-352. 1990.

TROUNSON; A.; ANDERIESZ; C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v. 121, p. 51-75. 2001.

UEHARA, T.; YANAGIMACHI, R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 457-70. 1976.

VANDEVOORT, C.A. High Quality Sperm for nonhuman primate ART: production and assessment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p. 33. 2004.

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

VAN STEIRTEGHEM, A.C. et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 8, n. 7, p. 1061-1066. 1993.

VARGA, E. et al. Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 226-233. 2008.

VERLHAC, M. et al. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. **Development**, v. 120, p. 1017-1025. 1994.

VIGNERON, C. et al. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitina inhibition of MPF activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 457-465. 2004.

VITULLO, A.D.; OZIL, J.P. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. **Developmental Biology**, v. 151, p. 128-136. 1992.

WEBB, R.J. et al. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. **Reproduction**, v. 123, p. 41-52. 2002.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 175-184. 2001.

WHITAKER, M.; PATEL, R. Calcium and cell cycle control. **Development**, v. 108, n. 4, p. 525-542. 1990.

WHITAKER, M. Control of meiotic arrest. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 127-135. 1996.

WILTON, L.J. et al. *In vitro* fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 481-486. 1993.

WOLF, D.P. Assisted reproductive technologies in rhesus macaques. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 37. 2004.

WOLF, D.P. Artificial insemination and the assisted reproductive technologies in non-human primates. **Theriogenology**, v. 71, p. 123–129. 2009.

WOLF, D.P. et al. *In vitro* fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 335-346. 1989.

WOLF, D.P. et al. Use of assisted reproductive technologies in the propagation of rhesus macaque offspring. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 486-493. 2004.

WRIGHT, E.M.; BUSH, D.E. The reproductive cycle of the capuchin (*Cebus apella*). **Laboratory animal science**, v. 27, n. 5, p. 651-654. 1977.

WU, G. et al. Microtubule and chromatin dynamics during fertilization and early development in rhesus monkeys, and regulation by intracellular calcium ions. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 260-270. 1996.

WU, B. et al. Dynamics of Maturation-Promoting Factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 253-259. 1997.

YEOMAN, R.R. et al. Low temperature storage of rhesus monkey spermatozoa and fertility evaluation by intracytoplasmic injection. **Theriogenology**, v. 63, p. 2356-2371. 2005.

YIN, H.; DUFFY, D.M.; GOSDEN, R.G. Comparative maturation of cynomolgus monkey oocytes *in vivo* and *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 14. 2006.

ZHENG, P. et al. Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined culture media and their functional assessment by IVF and embryo development. **Human Reproduction**, v. 16, p. 300-305. 2001.

ZHENG, P.; VASSENA, R.; LATHAM, K.E. Expression and downregulation of WNT signaling pathway genes in rhesus monkey oocytes and embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p. 667-677. 2006.

ZHENG, P. Effects of *in vitro* maturation of monkey oocytes on their developmental capacity. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 56-71. 2007.

ZHOU, Q. et al. A comparative approach to somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey. **Human Reproduction**, v.21, n. 10, p. 2564-2571. 2006.