

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GRACIELE FREITAS CARDOSO

**ADIÇÃO DE KISSPEPTINA NO MEIO DE FERTILIZAÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Uberlândia – MG

2018

GRACIELE FREITAS CARDOSO

**ADIÇÃO DE KISSPEPTINA NO MEIO DE FERTILIZAÇÃO
IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva).

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo

Coorientadora: Dra. Kele Amaral Alves

Uberlândia – MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C268a Cardoso, Graciele Freitas, 1984
2018 Adição de kisspeptina no meio de fertilização *in vitro* de embriões bovinos [recurso eletrônico] / Graciele Freitas Cardoso. - 2018.

Orientador: Gustavo Guerino Macedo.

Coorientadora: Kele Amaral Alves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.832>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Fertilização *in vitro*. 3. Bovino - Fecundidade. 4. Blastocisto. I. Macedo, Gustavo Guerino, (Orient.). II. Alves, Kele Amaral, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

ADIÇÃO DE KISSPEPTINA NO MEIO DE FERTILIZAÇÃO
***IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva)

Uberlândia, 27 de agosto de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo
(Orientador-FAMEV/UFU)

Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos
(Examinadora-FAMEV/UFU)

Dra. Amanda Nonato
(Examinadora-Laboratório IntelliGen/ABS Pecplan)

Aos meus pais Adelino (*in memoriam*) e
Divina Eterna com todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

“Gratidão pela infinitude que me trouxe até aqui” e a todos que passaram pela minha vida.

Aos meus pais, Adelino (*in memoriam*) e Divina Eterna, pela educação e valores passados. Vocês me legaram os bens mais preciosos. Ao meio tio José D’arc, ao qual serei eternamente grata por ter contribuído tanto na minha formação. Aos meus irmãos Cláudio, Júbia, Elízia e Adelino Filho por fazerem parte da minha vida e sempre torcerem por mim.

Aos inestimáveis amigos, que perto ou longe conhecem e participam da minha jornada.

Ao meu namorado Maltos Henrique, por todas as dádivas, ajuda e apoio nos momentos difíceis.

Aos professores do departamento de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Dra. Ricarda Maria dos Santos, Dra. Teresinha Assumpção e Dr. José Octávio Jacomini pelo incentivo e compreensão.

Aos graduandos, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda e boa convivência, especialmente a Mayara Mafra, Deize Antonino e Amanda Nonato por compartilharem um pouco do conhecimento e técnicas sobre a PIVE.

A minha coorientadora, Dra. Kele Amaral Alves, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Gustavo Guerino Macedo, pela confiança e oportunidade de aprendizado.

Ao Frigorífico Real por disponibilizar os ovários utilizados nesta pesquisa.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

“Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico, ele é também uma criança diante dos fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada.”

Marie Curie

ADIÇÃO DE KISSPEPTINA NO MEIO DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO

Objetivou-se avaliar diferentes concentrações de Kisspeptina (Kp) e o seu efeito na fertilização *in vitro* de embriões bovinos quanto à qualidade e taxas de desenvolvimento embrionário inicial. No Experimento 1 foi determinada a concentração mínima de Kp a ser utilizada no meio FIV, a partir dos tratamentos: controle (n=240); Kp 10^{-5} M (n=223); Kp 10^{-6} M (n=225) e Kp 10^{-7} M (n=245). No Experimento 2, os ovócitos, foram distribuídos em quatro tratamentos: controle (n=362); Kp 10^{-1} M (n=425), Kp 10^{-7} M (n=304), e antagonista P234 4×10^{-6} M (n=424). Os espermatozoides foram capacitados por gradiente descontínuo de Percoll[®], e co-incubados com os ovócitos por 16 a 18h em estufa de cultura a 38,5°C com 5% de CO₂. Após esse período, os zigotos foram incubados em Fluido Sintético de Oviduto (SOF) durante sete dias nas mesmas condições. A taxa de clivagem foi avaliada 48h após a fertilização e a taxa de blastocistos e estágio de desenvolvimento/qualidade no sétimo dia. Foi adotado um *escore* numérico de 1 a 4 para avaliação do estágio de desenvolvimento, onde 1 corresponde a blastocisto inicial, 2 blastocisto, 3 blastocisto expandido e 4 blastocisto eclodido. A qualidade foi avaliada por microscopia confocal 3D, e os dados analisados pelo PROC GLIMMIX/SAS e teste de Kruskal-Wallis. No Experimento 1, não houve diferença entre os tratamentos para taxas de clivagem e blastocistos respectivamente: controle (82,0%/34,2%); Kp 10^{-5} M (81,6%/26,9%); Kp 10^{-6} M (80,8%/29,3%) e Kp 10^{-7} M (80,8%/29,4%) ($P > 0,05$). No Experimento 2, as médias das taxas de clivagem e blastocisto foram semelhantes entre os tratamentos: controle (85,1%/38,1%), Kp 10^{-1} M (82,6%/33,6%), Kp 10^{-7} M (83,6%/34,9%) e P234 (81,4%/31,6%) ($P > 0,05$). Foram produzidos 514 embriões, com as seguintes médias de *escore* de desenvolvimento: controle 2,89; Kp 10^{-1} M 3,04; Kp 10^{-7} M 2,79 e P234 2,63, sem diferença estatística entre os mesmos ($P > 0,05$). Quanto à qualidade, foram avaliados 360 embriões, n=30/tratamento/corante. Os parâmetros observados foram produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), necrose, apoptose e potencial mitocondrial. Cada embrião forneceu de 3 a 8 imagens (n=1.492) com intensidade de fluorescência em pixels. O grupo controle apresentou maior porcentagem de ROS: controle 3,76%; Kp 10^{-1} M 0,25%; Kp 10^{-7} M 2,95% e P234 0,91% ($P < 0,05$). A porcentagem de degeneração celular foi semelhante entre os tratamentos: controle 1,51%; Kp 10^{-1} M 1,73%; Kp 10^{-7} M 4,71% e P234 1,98% ($P > 0,05$). A média de apoptose, foi semelhante entre os tratamentos: controle 2,79%; Kp 10^{-7} M 1,67% e P234 6,11% ($P > 0,05$). O potencial mitocondrial teve maior porcentagem no grupo P234: controle 0,51%; Kp 10^{-1} M 0,26%; Kp 10^{-7} M 0,22% e P234 1,43% ($P < 0,05$). A adição de kp-10 no meio de fertilização não interferiu nas taxas de clivagem e blastocisto, bem como no estágio de desenvolvimento embrionário. A Kp não teve efeito na apoptose, necrose, nem tampouco no potencial mitocondrial. Por outro lado, a Kp diminuiu os níveis intracelulares de ROS, sugerindo o seu envolvimento no controle antioxidante.

Palavras-chave: Antagonista P-234. Blastocistos. KISS1. KISS1R.

ADDITION OF KISSPEPTIN IN MEAN OF IN VITRO FERTILIZATION BOVINE EMBRYOS

ABSTRACT

The aim was to evaluate the different concentrations of Kisspeptin (Kp) and its effect in the process of *in vitro* fertilization of bovine embryos about the quality and production rates. In Experiment 1 the minimum concentration of Kp was determined to be used at medium FIV, starting from the treatments: control (n=240); Kp 10^{-5} M (n=223); Kp 10^{-6} M (n=225) and Kp 10^{-7} M (n=245). In Experiment 2, the oocytes were distributed in four treatments: control (n=362); Kp 10^{-1} M (n=425), Kp 10^{-7} M (n=304), and antagonist P234 4×10^{-6} M (n=424). The sperms were enabled by Percoll[®] discontinuous gradient, and coincubated with the oocytes from 16 to 18 hours in stove culture at 38.5°C with 5% of CO₂. After this period, the zygotes were incubated in Synthetic Oviduct Fluid (SOF) during 7 days in the same conditions. The rate of cleavage was evaluated 48 hours after fertilization and the rate of blastocysts and development stage/quality on the seventh day. A numerical *score* was adopted from 1 to 4 for evaluation of the development stage, as 1 corresponds to initial blastocyst, 2 blastocyst, 3 expanded blastocyst and 4 hatched blastocyst. The quality was evaluated by 3D confocal microscopy, and the analyzed data by PROC GLIMMIX/SAS and Kruskal-Wallis test. In Experiment 1, there wasn't difference between the treatments rates of cleavage and blastocysts respectively: control (82,0%/34,2%); Kp 10^{-5} M (81,6%/26,9%); Kp 10^{-6} M (80,8%/29,3%) and Kp 10^{-7} M (80,8%/29,4%) ($P > 0,05$). In Experiment 2, the averages from the rates of cleavage and blastocysts were similar between the treatments: control (85,1%/38,1%), Kp 10^{-1} M (82,6%/33,6%), Kp 10^{-7} M (83,6%/34,9%) and P234 (81,4%/31,6%) ($P > 0,05$). A total of 514 embryos were produced, with the following averages of development *score*: control 2,89; Kp 10^{-1} M 3,04; Kp 10^{-7} M 2,79 and P234 2,63, without statistical difference among them ($P > 0,05$). About the quality, 360 embryos were evaluated, n=30/treatment/coloring. The parameters observed were production of reactive oxygen species (ROS), necrosis, apoptosis and mitochondrial potential. Each embryo supplied from 3 to 8 images (n=1.492) with fluorescence intensity in pixels. The control group presented bigger percentage of ROS: control 3,76%; Kp 10^{-1} M 0,25%; Kp 10^{-7} M 2,95% and P234 0,91% ($P < 0,05$). The percentage of cellular degeneration was similar between the treatments: control 1,51%; Kp 10^{-1} M 1,73%; Kp 10^{-7} M 4,71% and P234 1,98% ($P > 0,05$). The average of apoptosis was similar between the treatments: control 2,79%; Kp 10^{-7} M 1,67% and P234 6,11% ($P > 0,05$). The mitochondrial potential had bigger percentage in the group P234: control 0,51%; Kp 10^{-1} M 0,26%; Kp 10^{-7} M 0,22% and P234 1,43% ($P < 0,05$). The addition of kp-10 amid fertilization didn't interfere in the rates of cleavage and blastocyst, as well as in the embryonic development stage. The Kp didn't have effect in the apoptosis, necrosis, nor even in the mitochondrial potential. On the other hand, the Kp decreased the intracellular levels of ROS, suggesting its involvement in the antioxidant control.

Key words: Antagonist P-234. Blastocysts. KISS1. KISS1R.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Características estruturais das kisspeptinas geradas a partir de um precursor comum codificado pelo gene KISS1(Pinilla, 2012)	21
Figura 2: Experimento 1 - Avaliação da quantidade mínima de Kp-10 para a fertilização	37
Figura 3: Experimento 2 - Suplementação com Kp-10 em meio de fertilização	38
Figura 4: Escores do estágio de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de Kp no meio TALP-FERT.	43
Figura 5. Fotomicrografia de epifluorescência de blastocistos corados com DCF associado à IP, YO-PRO-1 e JC-1 (aumento 20x).	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Taxas de clivagem e de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de Kp (Controle, Kp 10 ⁻⁵ M, Kp 10 ⁻⁶ M, Kp 10 ⁻⁷ M) no meio TALP-FERT ...	42
Tabela 2: Taxas de clivagem e blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> com Kp e seu antagonista (Controle, Kp 10 ⁻¹ M, Kp 10 ⁻⁷ M, P234 4x10 ⁻⁶ M) no meio TALP-FERT	42
Tabela 3: Porcentagem média do nível de espécies reativas de oxigênio de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> de acordo com os tratamentos Controle, Kp 10 ⁻¹ M, Kp 10 ⁻⁷ M e P-234.....	44
Tabela 4: Porcentagem média do índice de degeneração celular em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> nos tratamentos Controle, Kp 10 ⁻¹ M, Kp 10 ⁻⁷ M e P-234.....	45
Tabela 5: Porcentagem média do índice de apoptose celular em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> nos tratamentos Controle, Kp 10 ⁻¹ M, Kp 10 ⁻⁷ M e P-234.....	45
Tabela 6: Porcentagem média do índice de potencial de membrana mitocondrial em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> nos tratamentos Controle, Kp 10 ⁻¹ M, Kp 10 ⁻⁷ M e P-234	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Oogênese (oogênese).....	13
2.2 Foliculogênese	13
2.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	14
2.4 Processos envolvidos na fertilização <i>in vivo</i>	17
2.5 Kisspeptina	18
2.5.1 Nomenclatura e estrutura.....	18
2.5.2 Localização e distribuição anatômica KISS1/KISS1R.....	20
2.5.3 Interação regulatória da Kisspeptina com esteroides e gonadotrofinas.....	21
2.5.4 Sinalização via receptor KISS1R	21
2.5.5 Antagonista P234.....	22
2.5.6 Atuação da Kisspeptina no ovário	23
2.5.7 Atuação da kisspeptina na implantação e gestação	24
2.5.8 Possíveis aplicações terapêuticas da kisspeptina.....	25
2.6 Formas de avaliação da qualidade embrionária.....	27
2.6.1 Apoptose	28
2.6.2 Necrose	28
2.6.3 ROS	29
2.6.4 Potencial mitocondrial.....	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVO GERAL	33
4.1 Objetivos Específicos	33
5 HIPÓTESES	34
6 MATERIAL E MÉTODOS	35
6.1 Aspectos éticos	35
6.2 Reagentes.....	35
6.3 Delineamento experimental.....	35
6.4 Coleta e seleção dos complexos cumulus-ovócitos.....	36
6.5 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	37
6.6 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	37
6.7 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	38
6.8 Avaliação da qualidade embrionária.....	38

6.9 Análise estatística	39
7 RESULTADOS	41
8 DISCUSSÃO	46
9 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o Brasil se tornou referência mundial na produção *in vitro* de embriões bovinos, porém esta biotecnologia ainda possui limitações, pois embriões produzidos *in vitro* apresentam qualidade inferior aos produzidos *in vivo* já que as taxas de produção dos protocolos usuais não têm ultrapassado 40% (LONERGAN; FAIR, 2008). Assim, a fim de melhorar as taxas de produção, são elaborados meios de cultivo que ofereçam substâncias em concentrações semelhantes aos disponíveis no trato reprodutivo.

No microambiente folicular e tubárico, são encontradas substâncias tais como hormônios, sais, purinas, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e proteínas que quando suplementados em meios de cultivo podem aumentar as taxas de produção e qualidade embrionária (ALI; SIRARD, 2002).

A Kisspeptina (Kp) é um neuropeptídeo que foi identificado inicialmente como metastina devido a sua ação no controle da proliferação de células tumorais (LEE et al., 1996). Posteriormente, além da atuação como principal regulador do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, o seu envolvimento foi evidenciado no início da puberdade, na secreção de gonadotrofinas, gestação e implantação. Anormalidades na expressão e sinalização da Kp estão relacionadas a casos de disfunção ovariana e infertilidade feminina (ROA et al., 2008).

Estudos tem buscado compreender o efeito da Kp na regulação da função ovariana e nos mecanismos moleculares envolvidos, assim, a ação e produção local da Kp nos ovários tem despertado considerável interesse na PIVE. Evidências da atuação da Kp nos ovários foram relatadas na esteroidogênese, no desenvolvimento folicular, maturação ovocitária, e ovulação (SAADELDIN et al., 2012; MACEDO et al., 2013; ZHAI et al., 2017).

A expressão da Kp e seu receptor já foram identificados, nas células da teca, da granulosa, do complexo cumulus-ovócito, células intersticiais e espermatozoides (HSU et al., 2014; HE et al., 2015; BASINI et al., 2018). Entretanto, ainda são poucos os estudos sobre os efeitos da suplementação da Kp em meios de cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ovogênese

A ovogênese corresponde à sequência de eventos que envolve desde a formação e diferenciação das células germinativas primordiais até a fecundação do ovócito haploide (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Este processo se inicia ainda durante a fase embrionária e em bovinos ocorre por volta do trigésimo dia de gestação, esse desenvolvimento é controlado e dirigido pela secreção de citocinas e fatores de crescimento. Nesse momento, ocorre uma intensa proliferação por mitose e as células se tornam hipertróficas com acúmulo de nutrientes e redistribuição das organelas no citoplasma, sendo denominadas agora de ovogônias (PETERS, 1970; GORDON, 1994).

Em bovinos, depois de repetidas divisões mitóticas algumas ovogônias, por volta dos dias 72 a 82, iniciam a primeira divisão meiótica. Durante a prófase ocorre uma série de eventos como a espiralização e pareamento dos cromossomos homólogos e a recombinação do material genético ou *crossing-over*. Ao progredir para o diplóteno a célula entra em quiescência prolongada, nessa fase, a meiose é interrompida e as ovogônias agora denominadas de ovócitos primários permanecem em estágio de dictióteno ou vesícula germinativa (VG) até entrarem em atresia ou prosseguirem com a divisão (ERICKSON, 1966; FIGUEIREDO et al., 2008; SANCHÉZ; SMITZ, 2012).

A onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH) viabiliza o rompimento da VG e o ovócito retoma a meiose progredindo para metáfase I, anáfase I, telófase I. Ao completar o primeiro ciclo meiótico, ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar. Em seguida o ovócito atinge o estágio de metáfase II, e ocorre o segundo bloqueio da divisão meiótica, permanecendo assim até o momento da fecundação. Após a entrada do material genético do espermatozoide no citoplasma o ovócito completa a segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar. A interação do material genético masculino e feminino permite o retorno à configuração inicial formando um zigoto $2n$, que dará origem ao embrião (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; ADONA, 2006).

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese tem início durante a vida embrionária e é definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, compreende desde a formação do folículo primordial até o estágio de folículo de pré-ovulatório (SAUMANDE, 1991).

Os folículos primordiais são formados quando as células somáticas planas, também denominadas células da pré-granulosa, derivadas do epitélio celômico passam a circundar os ovócitos. Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram em quiescência, sendo que a retomada da proliferação pode ocorrer dias ou anos após a sua formação. A foliculogênese ocorre simultaneamente a ovogênese quando o ovócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, ou seja, a foliculogênese inicia-se após e termina antes do fim da ovogênese (ERICKSON, 1966; HIRSHFIELD, 1991). Em bovinos, os folículos primordiais já são observáveis em regiões mais profundas do córtex ovariano por volta de 85 dias de vida fetal (DINIZ et al., 2005).

A foliculogênese pode ser dividida em duas fases: a fase pré-antral, na qual ocorre a ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; e fase antral que abrange o crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Na fase pré-antral, o desenvolvimento dos folículos pré-antrais ou não cavitários, é predominantemente regulado por fatores intra-ovarianos e neste estágio o FSH assume apenas papel coadjuvante (XU et al., 1995; GONG et al., 1996).

Os folículos terciários ou antrais possuem células da granulosa organizadas em várias camadas, entre estas se forma uma cavidade ou antro. A formação do antro é característica exclusiva dos folículos terciários, e o fluido que o preenche é fonte de substâncias regulatórias derivadas das células da granulosa, como esteroides, enzimas, glicoproteínas, lipoproteínas e fatores de crescimento (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Outra característica dos folículos antrais é o desenvolvimento das camadas da teca interna e externa, da lâmina basal e células do cumulus (DRIANCOURT, 1991). Em bovinos, nos estágios iniciais, os folículos antrais medem de 1 a 3 mm de diâmetro (GINTHER et al., 2003).

2.3 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIVE é uma biotécnica de reprodução assistida, destinada ao melhoramento genético, aumento da eficiência produtiva de rebanhos, aprimoramento do conhecimento sobre os eventos fisiológicos da reprodução, entre outros fins. A PIVE corresponde a uma sequência de eventos que envolvem basicamente, os processos de obtenção de ovócitos, a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV).

O primeiro relato de animal nascido utilizando a técnica de produção *in vitro*, foi de um coelho em 1959 (CHANG, 1959). Em 1978 a PIVE se apresentou como metodologia de sucesso com a repercussão do nascimento do primeiro ser humano a partir do uso dessa biotécnica (STEPTOE; EDWARDS, 1978). Em bovinos, o primeiro nascimento de um bezerro foi obtido nos EUA em 1982 (BRACKETT et al., 1982), e ao final da década de 80 a PIVE em bovinos passou por uma grande expansão, ao difundir a utilização e estimulando o aperfeiçoamento de equipamentos e de metodologias empregadas (BOONE; SHAPIRO, 1990).

No Brasil, os primeiros nascimentos a partir de PIV de embriões bovinos foram obtidos em 1994, atividade que até o final da década de 90 era basicamente restrita a laboratórios de pesquisa e, portanto, sem muita expressão comercial. Porém, em um curto período de tempo, com a expansão da técnica nos laboratórios privados, a rentabilidade do setor agropecuário e o investimento em pesquisas, o país tornou-se o maior produtor mundial e referência no uso de PIVE em bovinos. (GALLI et al., 2003; RUMPF, 2007; PERRY, 2014).

A primeira etapa da PIVE é a coleta e preparação dos ovócitos para a maturação. Para o uso em pesquisa, os ovócitos geralmente são obtidos de ovários coletados em abatedouro. A obtenção se dá por aspiração folicular ou escarificação da córtex ovariana. Na aspiração são priorizados os folículos com 3-8 mm de diâmetro, ou seja, folículos que estejam na fase anterior à divergência folicular. Pois ovócitos coletados de folículos menores que 2 mm de diâmetro podem não ser capazes de reiniciar a meiose e aqueles acima de 8 mm já podem estar maturados ou entrando em processo de atresia. Os folículos entre 2-8 mm contêm ovócitos imaturos estacionados na prófase I da meiose, estes se mantêm estagnados dentro do folículo devido a fatores inibitórios do mesmo (SIRARD, 2001; GONÇALVES et al., 2008).

A maturação ovocitária completa envolve três níveis: maturação nuclear, citoplasmática e molecular. *In vivo*, a maturação nuclear do ovócito inicia após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e *in vitro*, a remoção do ovócito do ambiente folicular desencadeia a meiose. Em bovinos, a maturação nuclear do ovócito demanda de 22-24h e compreende a progressão do estágio diplóteno da prófase I meiótica para metáfase I, caracterizada pela ruptura do envelope nuclear, em seguida avança para metáfase II, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Nesta fase o ovócito fica retido até o momento da fecundação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; GONÇALVES et al., 2008). Paralelamente à maturação nuclear, ocorre a maturação citoplasmática evidenciada pela reorganização das organelas, como a redução do aparelho de Golgi, o aparecimento de ribossomos adjacentes aos cromossomos, rearranjo das mitocôndrias, alinhamento dos grânulos corticais próximos à

membrana plasmática e contínuo desenvolvimento dos estoques de lipídios (DIELEMAN et al., 2002). Já a maturação molecular está relacionada ao armazenamento, transcrição e processamento de RNAm que capacita o ovócito para promover cascatas moleculares necessárias para a ativação do genoma embrionário (SIRARD et al., 2006).

Durante a FIV espermatozoides e ovócitos maduros são co-incubados em meio específico, por um período de 18-22 horas. Antes, porém, os espermatozoides viáveis precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e células mortas. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de Percoll[®] e o swim-up. O Percoll[®] é composto por partículas de sílica coloidais cobertos por polivinilpirrolidona em diferentes concentrações para formar um gradiente necessário de separação espermática. Na seleção pelo método de Percoll[®], o sêmen é centrifugado passando por diferentes gradientes (GONÇALVES et al., 2008). Durante a capacitação espermática ocorre a remoção e alteração de glicoproteínas periféricas, redução nos níveis de colesterol e mudanças na distribuição e composição de alguns fosfolipídios de membrana. Essas alterações desencadeiam fatores responsáveis pela interação do espermatozoide com receptores do ovócito, como por exemplo, a reação acrossômica e o aumento intracelular de cálcio (GORDON, 1994). O espermatozoide ao se fundir com a membrana estimula o ovócito a completar a meiose, ocorrendo a expulsão do segundo corpúsculo polar. O zigoto é então formado a partir da junção dos pró-núcleos masculinos e femininos. Assim, com um novo arranjo citoplasmático inicia-se uma série de divisões mitóticas, até a formação do blastocisto (GONÇALVES et al., 2008).

O cultivo *in vitro*, requer um sistema capaz de proporcionar condições adequadas para as primeiras clivagens, ativação do genoma embrionário e desenvolvimento até o estágio de blastocisto, período que varia de 7-9 dias. O fluido sintético de oviduto ou meio SOF foi criado, como o nome sugere, baseado na constituição do fluido do oviduto de bovinos. Atualmente é o meio que proporciona um ambiente mais adequado para a expressão de genes relacionados à pré-implantação de embriões (WRENZYCKI et al., 2001). O aperfeiçoamento dos meios podem incluir modificações em seu conteúdo, entre as quais o seu enriquecimento com carboidratos e aminoácidos responsável pela elevação das taxas de blastocisto em níveis superiores a 50% no quinto dia de desenvolvimento e a elevação das taxas de implantação superior a 40% (GARDNER et al., 1998).

Na PIVE comercial apenas cerca de 30% a 50% dos ovócitos inseminados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação ficam em torno de 35% (DAYAN et al., 2000). Os meios de cultivo têm um papel crucial no condicionamento e viabilidade do embrião. Em

vista disso, ao longo dos anos novos sistemas de cultivo *in vitro* foram criados, testados e aperfeiçoados, buscando melhorar a produção e o desenvolvimento embrionário adequado.

2.4 Processos envolvidos na fertilização *in vivo*

No processo *in vivo*, a fertilização ocorre na ampola do oviduto. Os ovidutos são órgãos pares que se estendem desde a extremidade dos cornos uterinos até a proximidade dos ovários. São divididos funcionalmente em quatro regiões: fimbrias, infundíbulo, ampola e istmo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Durante a ovulação, o ovócito é capturado pelas fimbrias do infundíbulo, este por sua vez, possui pregas revestidas por uma grande quantidade de células ciliadas que direcionam o ovócito até a região da ampola (MONTEIRO et al., 2003).

Para chegar até a ampola, os espermatozoides entram em contato com substâncias presentes no sistema reprodutor feminino que induzem a sua capacitação. Quando alcançam o istmo ocorrem as principais alterações bioquímicas. Nesta região glicosaminoglicanos alteram a fluidez e o teor lipídico da membrana plasmática provocando uma hiperativação espermática. A desestabilização da membrana plasmática do espermatozoide permite a sua ligação a zona pelúcida do ovócito, onde ocorre a reação acrossômica. Nessa fase há liberação da acrosina, esta enzima possui ação proteolítica e facilita a penetração do material genético do espermatozoide através da zona pelúcida. A ligação do espermatozoide desencadeia a reação cortical no ovócito bloqueando a poliesperminação. Ao ser liberado no citoplasma do ovócito, o material genético paterno ativa o gameta feminino e este retoma a divisão meiótica liberando o segundo corpúsculo polar. A partir de então, o zigoto passa por inúmeras clivagens até a formação do blastocisto, estágio verificado geralmente no sétimo dia de desenvolvimento (GONÇALVES et al., 2008).

Em bovinos, o desenvolvimento embrionário inicial é dependente de mRNA e proteínas acumuladas durante a maturação citoplasmática, sendo que a ativação do genoma embrionário, fase conhecida como transição materno-zigótica, normalmente ocorre na fase de 8-16 células (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001).

Ainda no istmo, o fluido do oviduto fornece diversas proteínas, aminoácidos, íons, e enzimas antioxidantes necessárias para um desenvolvimento embrionário inicial adequado. A composição do fluido do oviduto sofre alterações cíclicas sob a influência de hormônios esteroides, (BUHI, 2002). Essas mudanças criam um microambiente essencial dentro do oviduto que supre as necessidades celulares de acordo com o estágio de desenvolvimento.

Após a fertilização e desenvolvimento embrionário, a camada muscular e as células ciliadas que revestem o istmo promovem movimentos de contração que direcionam o embrião para o interior do útero, onde este se fixa (MONTEIRO et al., 2003).

Todo esse processo envolve fluidos luminais com características fisiológicas e bioquímicas distintas. Os hormônios ovarianos são os principais responsáveis pela atividade secretora dos epitélios cervical, uterino e do oviduto. Os fluidos produzidos ao longo dessas regiões apresentam diferenças no conteúdo proteico, na atividade enzimática e na composição dos eletrólitos. Estas substâncias têm grande influência na sobrevivência dos gametas e na qualidade e expressão gênica dos embriões (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Uma das substâncias presentes no fluido do oviduto e que recentemente apresentou resultados promissores no controle local da reprodução é o neuropeptídeo Kisspeptina, tendo sido inclusive demonstrado a sua variação de expressão e concentração durante o ciclo reprodutivo em diversas espécies (ECHEVERRIA et al., 2014; CIELESH et al., 2017; TANYAPANYACHON, et al., 2018).

2.5 Kisspeptina

2.5.1 Nomenclatura e estrutura

A Kisspeptina foi inicialmente denominada de metastina, devido a sua expressão ter sido observada pela primeira vez em células tumorais e nas quais suprimiam a metástase. A base para a descoberta da Kp surgiu a partir da identificação de um gene em 1996 por um grupo de pesquisadores da Universidade da Pensilvânia, na cidade de Hershey (EUA). Como homenagem a cidade, na qual também está localizada a empresa fabricante do chocolate Hershey Kisses[®], o gene foi nomeado KISS1. A terminologia ‘SS’ também se refere a uma sequência supressora (LEE et al., 1996).

As Kps são neuropeptídios da família Rfamida cujos membros apresentam na porção Carboxi-terminal a sequência (Arg-Phe-NH₂). Em humanos, o gene KISS1 foi mapeado no cromossomo 1q32-q41 e é composto por quatro éxons, sendo que o primeiro e o segundo não são traduzidos, o terceiro e quarto éxon são traduzidos parcialmente e a sequência completa do gene é codificada por 438 pares de base (WEST et al., 1998).

O gene KISS1 expressa o precursor prepro-kisspeptina uma proteína hidrofílica de 145 aminoácidos que após passar por clivagens proteolíticas ou degradação formam o maior e

mais abundante peptídeo na circulação humana, a kisspeptina-54 (kp-54) com 54 aminoácidos. Dos fragmentos derivados da kp-54, já foram identificados três peptídeos neuroativos kisspeptina-14 (kp-14), kisspeptina-13 (kp-13) e kisspeptina-10 (kp-10) (Figura 1). Entre os quatro neuropeptídios, a Kp-10 é a que possui maior conservação da sequência de aminoácidos entre as espécies e pode apresentar até 10 vezes mais afinidade pelo seu receptor que os demais (KOTANI et al., 2001; STAFFORD et al., 2002; TSUTSUI et al., 2010).

As Kps compartilham os últimos dez aminoácidos (112-121 aa), sendo esta a região responsável pela ligação ao receptor. Esta porção também pode estar envolvida na estabilização e proteção contra digestão proteolítica, mantendo-a preservada entre vertebrados mamíferos ou não. Esta estabilidade denota um importante papel de atuação da Kp numa grande variedade de espécies (OHTAKI et al., 2001; BIRAN et al., 2008).

O GPR54 é um receptor com sete domínios transmembrana, composto por 398 aminoácidos. Este, foi descrito por Lee et al. (1999) como um receptor acoplado a proteína G e portava 45% de homologia com os receptores transmembranares do neuropeptídeo galanina, no entanto, apesar da similaridade, o receptor não se ligava a esta proteína. Posteriormente, a Kp foi identificada como o ligante natural do GPR54 (KOTANI et al., 2001), que passou a ser denominado KISS1R (GOTTSCHE et al., 2009).

A ausência de um dos 10 aminoácidos ou do grupo amida na extremidade carboxi-terminal, faz com que o receptor KISS1R perca drasticamente a afinidade pela Kp. Assim as primeiras evidências do papel da Kp-KISS1R no controle da reprodução, vieram de estudos que relataram que mutações no gene KISS1R estavam associadas à ocorrência de hipogonadismo-hipogonadotrófico, uma condição de atraso ou ausência da puberdade provocada pela deficiência na secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (MUIR et al., 2001; DE ROUX et al., 2003, SEMINARA et al., 2003).

Desta forma, a partir de vários estudos posteriores, a Kp e seu receptor foram considerados os principais reguladores do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) sendo apontada como a mais importante descoberta na neuroendocrinologia após o isolamento do hormônio liberador de gonadotrofina GnRH (ROA et al., 2008).

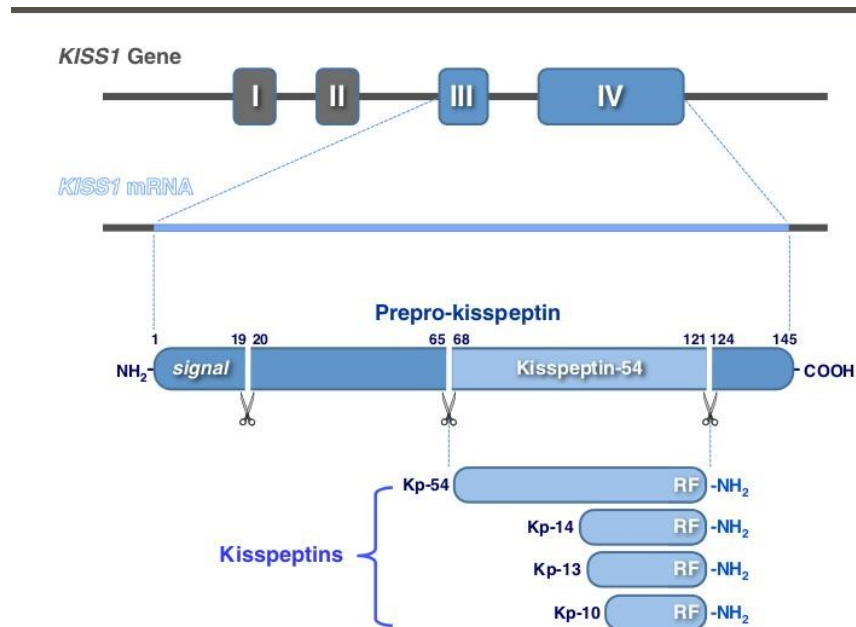


Figura 1: Características estruturais das kisspeptinas geradas a partir de um precursor comum codificado pelo gene KISS1. Fonte: Pinilla (2012).

2.5.2 Localização e distribuição anatômica KISS1/KISS1R

A distribuição dos neurônios kisspeptinérgicos no hipotálamo varia de acordo com a espécie. Em alguns mamíferos já estudados, como roedores, equinos, humanos, o gene KISS1R é expresso nos neurônios localizados em duas regiões principais: na área pré-óptica (POA) da região periventricular (PeV) e no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (FRANCESCHINI et al., 2006; CLARKSON et al., 2009; MAGEE et al., 2009; HRABOVSKY et al., 2010). A população de neurônios kisspeptinérgicos está distribuída de forma semelhante em ambos os sexos, em ratas (CLARKSON; HERBISON, 2006).

Os neurônios KISS1 direcionam projeções que fazem sinapse com as membranas celulares de outros neurônios através de seus receptores KISS1R. Experimentos demonstraram que a administração central ou periférica de Kp estimula de forma considerável a secreção de gonadotrofinas, evidenciando que os neurônios de GnRH são ativados diretamente pela Kp (DHILLO et al., 2005; SMITH et al., 2009).

O cultivo *in vitro* de células hipofisárias de bovinos e suínos em meio enriquecido com Kp-10, promoveu um aumento na quantidade de LH liberado, sugerindo assim uma ação direta da Kp sobre a hipófise (SUZUKI et al., 2008). Em humanos, durante a gestação, a Kp e o KISS1R são altamente expressos na placenta, indicando a existência de um papel fisiológico

anti-metástático relacionado ao controle da migração das células trofoblásticas do embrião (HORIKOSHI et al., 2003).

A presença de KISS1/KISS1R já foi detectada nos ovários, folículos, ovócitos, células da granulosa e corpo lúteo. No entanto, em fêmeas pré-púberes, a expressão do KISS1 é ausente nos ovários (Cielesh et al., 2017).

2.5.3 Interação regulatória da Kisspeptina com esteroides e gonadotrofinas

O mecanismo completo de liberação do GnRH induzido pela ação da Kp, ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que esse neuropeptídeo despolariza os neurônios GnRH, através do fechamento dos canais de K da membrana celular pelo Ca^{2+} e da abertura dos canais Na^{+} dependentes, canais catiônicos não seletivos, estimulando a liberação do hormônio (HAN et al., 2005, LIU et al., 2008).

A liberação do GnRH pela ação da Kp pode ser influenciada por vários fatores como a interação com hormônios gonadais e outros neuropeptídeos, déficit nutricional e fotoperíodo (CARATY et al., 2007; GOODMAN et al., 2010, TENA-SEMPERE, 2010).

Estudo realizado com ovelhas e roedores demonstrou que o estrógeno e a testosterona são capazes de suprimir os níveis do RNAm de KISS1 no hipotálamo, mais precisamente no ARC. Ovelhas que passaram por gonadectomia tiveram a expressão de RNAm KISS1 aumentada no ARC, em contrapartida o fornecimento exógeno de esteroides sexuais reduziu a expressão de KISS1, contribuindo para o feedback negativo de GnRH/LH. No entanto, no AVPV, a gonadectomia, diminui expressão de RNAm KISS1 (SMITH et al., 2005a, 2005b; SMITH, et al., 2009). Logo, a Kp pode intermediar tanto o *feedback* positivo quanto o negativo dos esteroides sexuais sobre a liberação de GnRH.

O sistema KISS1/KISS1R atua como regulador excitatório fundamental dos neurônios GnRH. Em estudos com ratos, o tratamento com antagonistas de Kp, anulou a expressão do gene KISS1R nos neurônios GnRH (IRWIG et al., 2004; HERBISON et al., 2010). Assim a ausência da Kp leva a supressão da secreção de GnRH e conseqüentemente das gonadotrofinas LH e FSH (HASHIZUME et al., 2010).

2.5.4 Sinalização via receptor KISS1R

O KISS1R é extensivamente expresso no hipotálamo, bem como em regiões corticais e subcorticais do sistema nervoso, podendo ser encontrado ainda no fígado, intestino, testículo, ovário e em tecidos periféricos como placenta e gonadotrofos hipofisários (LEE et al., 1999; MUIR et al., 2001; RICHARD et al., 2009).

Ao se ligarem ao KISS1R, as Kps induzem a cascata de receptores acoplados à proteína Gαq/11 ativando a fosfolipase C (PLC), com a subsequente hidrólise do bifosfato de fosfatidilinositol (PIP 2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP 3) e em diacilglicerol (DAG), ambos atuando como mensageiros. O IP3 é um mediador hidrossolúvel e o seu acúmulo no citoplasma leva a mobilização das reservas celulares de Ca²⁺ do retículo endoplasmático para o citosol. O DAG é uma substância lipofílica presente na membrana celular que ativa a proteína quinase-C (PKC), esta por sua vez catalisa a fosforilação de proteínas quinases ativada por mitógeno (MAPK), como as ERK1/2 e p38 (CASTAÑO et al., 2009).

Análises em tecidos hipotalâmicos cultivados *ex vivo*, mostraram que o bloqueio de ERK1/ERK2 e p38 é capaz de suprimir completamente a secreção de GnRH induzida por kp-10, evidenciando que a mesma estimula a secreção de GnRH pelos neurônios GnRH hipotalâmicos via ativação de KISS1R (KOTANI, et al., 2001; CASTELLANO, et al., 2006).

2.5.5 Antagonista P234

Os primeiros antagonistas da Kp foram sintetizados por Roseweir et al. (2009) ao modificarem a sequência central da Kp-10 através de substituições sistemáticas de aminoácidos e truncamentos na região terminal NH₂. Como resultado, cerca de 100 compostos foram inicialmente identificados, no entanto, poucos peptídeos apresentaram atividade antagonística promissora. Dentre eles, o peptídeo 234 (P234) ([D-A] NWNGFG [D-W] RF-NH₂) foi o que demonstrou maior afinidade de ligação com o receptor KISS1R, bem como, a capacidade de inibir a produção de fosfato de inositol estimulada pela Kp-10, interferindo assim na sua sinalização.

O desenvolvimento de um antagonista permitiu a compreensão e identificação de algumas funções da Kp até aquele momento pouco esclarecidas. Desde então, estudos *in vitro* e *in vivo* têm descrito o efeito desse análogo numa variedade de espécies. Em ratas, o P234 regulou os efeitos da Kp na reprodução interferindo no início da puberdade e no pico pré-ovulatório de gonadotrofinas, além disso, foi capaz de bloquear o efeito anorético da Kp, influenciando conseqüentemente no balanço energético (SAHIN et al., 2015). Em macacas pré-púberes o antagonista inibiu a ativação dos neurônios GNRH e reduziu a secreção pulsátil

do GNRH (ROSEWEIR et al., 2009). Outras pesquisas, utilizando ovelhas ovariectomizadas, demonstraram que a infusão do P234 estimulou a secreção do GH e reduziu os pulsos de LH (PINEDA et al., 2010; SMITH et al., 2018). Assim, como várias patologias estão associadas às disfunções do eixo HPG, os antagonistas da Kp podem oferecer novos tratamentos para as condições de infertilidade, atraso e precocidade da puberdade, síndrome do ovário policístico, entre outras.

2.5.6 Atuação da Kisspeptina no ovário

Os genes KISS1 e KISS1R são expressos nos ovários em diferentes espécies. Trabalhos demonstraram que a expressão do gene KISS1 varia durante o ciclo estral com um aumento acentuado no proestro tardio, o que pressupõe que a expressão ovariana de KISS1 está sob a regulação das gonadotrofinas. A presença da Kp já foi confirmada em diversos compartimentos do ovário, como na camada da teca, células da granulosa, ovócito, no epitélio da superfície ovariana e no corpo lúteo (CASTELLANO et al., 2006; GAYTÁN et al., 2009; SAADELDIN et al., 2012).

O desenvolvimento folicular e a ovulação são controlados por duas vias, uma nervosa simpática e outra endócrina, embora sejam independentes essas vias atuam de forma conjunta na regulação da função ovariana. A Kp extraovárica é sintetizada no gânglio celíaco, que faz parte da via neuronal do eixo hipotálamo-glânglio-celíaco-ovário, deste glânglio parte o nervo ovariano superior que inerva diretamente o ovário, mais especificamente as células da teca. A Kp intraovárica está presente em todos os folículos em desenvolvimento, o que permite sugerir a sua função esteroidogênica e protetora do processo ovulatório (GERENDAI et al., 1998; RICU et al., 2012).

O envelhecimento reprodutivo caracteriza-se pela diminuição da expressão do gene KISS1 a nível hipotalâmico. Por outro lado, foi observado em ratas que durante o período de senescência reprodutiva, ocorre um aumento do tono simpático no ovário, que por sua vez, impulsiona a expressão de Kp intraovárica, aumentando o recrutamento folicular durante o período de subfertilidade (HEIDER et al., 2001; FERNANDOIS et al., 2016; MERHI et al., 2016).

Em ratas o aumento do hormônio luteinizante durante o proestro, eleva a síntese da Kp em células da granulosa, sugerindo um papel no processo de luteinização. A administração intermitente de kp-10, em bezerras pré-púberes, aumentou consideravelmente os níveis de

LH, induziu a ovulação e luteinização em animais com concentrações séricas elevadas de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina1) e baixas de leptina, porém não foi o suficiente para induzir o ciclo estral (SANTOS ECHEVERRÍA, et al., 2014; LAOHARATCHATATHANIN, et al., 2015).

Saadeldin et al. (2012) verificaram as expressões do gene KISS1 e KISS1R tanto nas células da granulosa quanto no ovócito de suínos. Neste mesmo estudo, a Kp adicionada ao meio de maturação de ovócitos, promoveu o aumento das taxas de expulsão do corpúsculo polar, formação de blastocisto e proliferação celular. Entretanto, a suplementação durante o cultivo comprometeu o crescimento trofoblástico, refletindo a regulação sistêmica ou local durante o período inicial crítico do desenvolvimento embrionário.

GAYTÁN et al. (2007), descreveram o padrão da imunorreatividade do KISS1R e da expressão do gene KISS1 em ovidutos de ratas. Neste estudo, o KISS1R, seguiu um padrão de distribuição de acordo com a região, sendo observada uma forte expressão no istmo, baixa expressão na ampola proximal e ausência no infundíbulo. O RNAm de KISS1, por outro lado, foi detectado nas amostras de ovidutos em todas as fases do ciclo estral com pico de expressão em proestro/estro e níveis mais baixos no diestro.

2.5.7 Atuação da kisspeptina na implantação e gestação

A Kp e KISS1R exercem um papel fundamental no estabelecimento da gestação, a qual é caracterizada pela ligação do blastocisto a decídua uterina. Essa adesão é a primeira etapa da implantação e ocorre em humanos em torno dos dias 6-7 após a concepção. A parede exterior do blastocisto é composta por uma camada de células de trofoblasto, que após a implantação, proliferam e se diferenciam em duas linhagens: os trofoblastos vilosos e extravilosos. Os trofoblastos extravilosos degradam a matriz celular tornando as células móveis e invasivas. Essa invasão se orienta na direção das artérias espiraladas do útero estabelecendo o fornecimento de oxigênio e nutrientes adequados para o desenvolvimento do feto (HIDEN, et al.,2007).

Apesar da invasão trofoblástica se assemelhar à metástase tumoral, esse processo fisiológico é bem regulado de forma temporal e espacial (SOUNDARARAJAN; RAO, 2004). A característica antimetástática da Kp inibe a migração e a invasão de células trofoblásticas. Em humanos, foi observado maior expressão de Kps e KISS1R nestas células durante o primeiro trimestre e em ratos no 12,5º dia de desenvolvimento embrionário. Esse período

coincide com o pico de invasão trofoblástica, fase considerada crítica para o estabelecimento da gestação (BILBAN et al., 2004; MARK et al., 2013).

De fato, foi verificado em humanos que altos níveis de atividade de KISS1R na placenta inibem a invasão trofoblástica e a angiogênese, fatores que estão associados aos quadros de pré-eclâmpsia. A diminuição na expressão de Kp nas células trofoblásticas também pode estar envolvida em perdas recorrentes de gestação (CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012; PARK et al., 2012).

Em ratas, a administração intracerebroventricular de Kp aumentou a taxa de ativação de neurônios de oxitocina na fase final da gestação (18-21 dias), porém não em gestação média ou inicial, sugerindo que a expressão de Kp é regulada positivamente na projeção do núcleo periventricular para a zona perinuclear do núcleo supraóptico no final da gestação. A ativação dos neurônios de oxitocina é fundamental durante o parto, pois ela induz as contrações do músculo uterino além de estimular a secreção de leite (SEYMOUR et al., 2017).

2.5.8 Possíveis aplicações terapêuticas da kisspeptina

Inicialmente identificadas como supressoras de metástase humana, as Kps, nos últimos anos, tem ganhado destaque nas pesquisas científicas em função de seu importante papel na reprodução de várias espécies, o que tem validado o potencial desse neuropeptídeo como um novo agente terapêutico em distúrbios reprodutivos.

O interesse científico pela Kp na área de reprodução aumentou após pesquisadores relacionarem alguns casos de hipogonadismo hipogonadotrófico, a mutações no gene KISS1R de humanos e camundongos. Essas pesquisas demonstraram que deleções específicas ou mutações espontâneas no gene KISS1R prejudicam a maturação sexual (DE ROUX et al., 2003; FUNES et al., 2003; SEMINARA et al., 2003).

Dessa forma, estudos sequentes mostraram que a administração de Kp exógena em roedores e macacos pré-púberes foi capaz de iniciar aspectos da puberdade precoce, como a secreção de LH e abertura vaginal (NAVARRO et al., 2004; SHAHAB et al., 2005).

Baixas concentrações de testosterona sérica é normalmente observado em homens com diabetes tipo 2. A administração contínua de Kp-10, em homens com hipogonadismo associado ao diabetes tipo 2, aumentou a frequência pulsátil e a secreção de LH e normalizou

os níveis de testosterona no soro. Esses resultados sugerem um novo potencial terapêutico para os análogos de Kp no tratamento de hipogonadismo no diabetes (GEORGE et al., 2013).

Em um estudo com mulheres com subfertilidade e submetidas à terapia de fertilização *in vitro*, Jayasena et al. (2014), demonstraram que uma única injeção subcutânea de Kp-54 foi suficiente para induzir a maturação ovocitária resultando em gestação bem-sucedida.

Em ovelhas foi demonstrado que a expressão do mRNA do KISS1 é reduzida durante o período de anestro e que a mesma aumenta com o início da estação reprodutiva (SMITH et al., 2007). Um estudo subsequente mostrou que a infusão sistêmica de kp-10 em ovelhas acíclicas promoveu a ovulação em mais de 80% dos animais tratados. Esses resultados indicam que a administração de Kp pode estimular a ovulação em fêmeas acíclicas e ainda fornecem estratégias para a manipulação da secreção de gonadotrofinas (CARATY et al., 2007).

Estudos recentes, indicaram que a kp-10 tem atividade biológica comparável à gonadotrofina coriônica humana (hCG) para induzir a ovulação de marrãs pré-púberes. Neste trabalho, a administração intramuscular de kp-10 resultou em número de ovulações semelhantes ao grupo tratado com hCG, e ambos tiveram números maiores de ovulações quando comparados aos grupos controle e tratado com gonadotrofina coriônica equina (eCG) (NATAL et al., 2016).

Em bovinos pré-púberes, de ambos os sexos, a administração periférica de kp-10 estimulou a liberação de GH, LH e FSH. Neste trabalho, a resposta na administração via intravenosa foi superior quando comparado à via intramuscular, sugerindo que a Kp pode sofrer algum tipo de inativação nesse último tipo de administração (KADOKAWA et al., 2008; AHMED et al., 2009).

Na PIVE, a suplementação da Kp em meios de cultivo aumentou as taxas de maturação, taxa de formação de blastocisto e contagem total de células de blastocistos de ovócitos suínos, bovinos e ovinos. A adição da Kp promoveu ainda o aumento da expressão de genes maternos e diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), indicando uma função antioxidante no cultivo *in vitro* (SAADELDIN et al., 2012; OLIVEIRA, 2016; BYRI et al., 2017)

A Kp tem se mostrado uma alternativa promissora na substituição de algumas drogas comumente utilizadas na indução e hiperestimulação ovariana nas técnicas de reprodução assistidas. Além da aplicabilidade em tratamentos de distúrbios de infertilidade, tem-se a possibilidade de uso da Kp no tratamento de câncer relacionado a distúrbios hormonais como

tumores de mama e próstata (OLBRICH et al., 2010; GEORGE et al., 2011). Assim, se torna imprescindível o desenvolvimento de novos estudos em modelos animais que possam descrever e compreender melhor os mecanismos de ação da Kp.

2.6 Formas de avaliação da qualidade embrionária

A eficiência do cultivo *in vitro* pode ser determinada por mudanças fisiológicas decorrentes das interações entre as células e com as substâncias do meio de cultura, assim estas alterações celulares são consideradas importantes indicadores de viabilidade e qualidade celular. Dentre esses indicadores, destacam-se os processos de morte celular, a necrose e a apoptose, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o potencial mitocondrial, os quais têm sido amplamente utilizados como parâmetros para avaliação da qualidade de embriões produzidos *in vitro*, através da microscopia de fluorescência (FEUGANG et al., 2004; SARTORELLI et al., 2006; DOS SANTOS JUNIOR et al.; 2013). As amostras coradas com sondas fluorescentes emitem luz com comprimentos de onda ou cores diferenciadas, que variam em função da integridade e condição funcional da estrutura analisada. Dessa forma, a utilização de sondas fluorescentes, isoladas ou combinadas, tem permitido evidenciar e monitorar estruturas, compartimentos e interações moleculares específicas envolvidas no metabolismo celular.

Os marcadores fluorescentes atuais são compostos de pequenas moléculas de corantes denominados de fluoróforos ou fluorocromos. O tempo de vida (τ) de um fluoróforo pode ser mensurado pelo tempo médio que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental. Outra característica dos fluoróforos é que a luz emitida por estes geralmente se situa na faixa de comprimentos de onda do espectro visível, ou seja, entre o infravermelho de 700 nm e o ultravioleta de 400 nm. O espectro eletromagnético corresponde ao conjunto de todas as ondas eletromagnéticas, ordenadas de acordo com a intensidade da radiação de seus comprimentos de onda. Os fluoróforos podem ser divididos em duas classes: os intrínsecos que emitem luz naturalmente e os extrínsecos que são adicionados a uma determinada amostra para desempenharem o papel de sonda (PETROV; SCHWILLE, 2008).

As atividades metabólicas podem ser influenciadas pela composição do meio e condições do ambiente de cultivo (LONERGAN et al., 2006). Sendo assim, a técnica de fluorescência tem permitido avaliar várias variáveis do estado fisiológico durante o processo

de cultivo de embriões, como por exemplo, apoptose, degeneração celular, ROS e potencial mitocondrial.

2.6.1 Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico normal programado pela própria célula e tem papel importante no desenvolvimento embrionário, como por exemplo, na eliminação de células anormais. Durante o cultivo *in vitro*, condições sub-ótimas como a exposição à luz e ao estresse oxidativo, podem causar danos graves ao DNA levando à ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, de caspases, e oncogenes como o p53 (MATWEE et al., 2000; HARDY et al., 2003).

O YO-PRO-1 (YP) é um dos marcadores mais utilizados para detecção da apoptose em embriões pré-implantacionais. Esse corante nuclear de fluorescência verde e tamanho relativamente grande (630 Da) não consegue penetrar células com membranas intactas, o que possibilita a quantificação de viabilidade e morte celular (FUJISAWA et al., 2014).

Em embriões bovinos, a apoptose geralmente é observada após o estágio de mórula e blastocisto (8 a 16 células), fases em que a proliferação celular começa a passar por um controle de expansão tanto para manter a homeostase quanto para eliminar células anormais (FREI et al., 1989).

2.6.2 Necrose

A necrose corresponde à morte celular patológica ou acidental, geralmente envolvendo um grupo celular e não células isoladas. Nesse processo a exposição a injúrias danificam as organelas, comprometendo o equilíbrio interno, assim, água e íons fluem livremente para dentro da célula tornando-a túrgida. A pressão interna rompe a membrana plasmática e os componentes celulares são liberados, incluindo enzimas hidrolíticas e substâncias tóxicas que causam danos às células vizinhas. O extravasamento dessas substâncias atraem células do sistema imune, levando a uma reação inflamatória no tecido circundante. As células mortas são então digeridas por neutrófilos e macrófagos (MAJNO; JORIS, 1995; ABASTADO, 1996).

O Iodeto de Propídeo (IP) é um corante que possui afinidade pelo DNA. As células necróticas são permeáveis ao IP que coram a cromatina em vermelho ou laranja. As

membranas plasmáticas de células viáveis são impermeáveis a este corante, o que permite a diferenciação entre células vivas e mortas, bem como, determinar a porcentagem de células com núcleo fragmentado. Além do DNA, o IP também cora RNAs presentes no citoplasma (SUZUKI et al, 1997).

2.6.3 ROS

As ROS são moléculas eletronicamente instáveis derivadas do oxigênio que apresentam elétrons não pareados na sua órbita mais externa, o que lhes conferem a capacidade de interagir com outras moléculas. Quando estas moléculas recebem elétrons, exercem a função de agentes oxidantes, ou agentes redutores quando doam elétrons (AGARWAL et al., 2005).

Embriões cultivados *in vitro* sob uma concentração de 20% oxigênio (O_2) estão mais propensos à formação de ROS, quando comparado ao desenvolvimento *in vivo*, cuja concentração de O_2 na tuba uterina varia entre 5% a 8% (HARVEY, 2007). Embora a condição de aerobiose seja indispensável para o desenvolvimento celular, a cadeia respiratória mitocondrial, produz metabólitos como a ROS, que em grande quantidade, são prejudiciais ao desenvolvimento embrionário.

As principais ROS gerados no cultivo de embriões bovinos são os radicais ânion superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além da alta tensão de O_2 na PIVE, o excesso de manipulação e a exposição à luz, também favorecem a formação de ROS. Quando há uma produção excessiva de ROS que ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, ocorre o estresse oxidativo. Esse estresse pode causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos comprometendo a eficiência da produção *in vitro* de embriões (ANDRADE et al., 2010; SILVA et al., 2011). Dessa forma, vários estudos têm buscado alternativas para reduzir o estresse oxidativo através da suplementação com substâncias antioxidantes nos meios de cultivo.

A mensuração dos níveis intracelulares de ROS pode ser realizada com a utilização da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2', 7'- 32 diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA , DCF). O fluorocromo DCF é oxidado pelos radicais peróxidos de hidrogênio, seus derivados, outros peróxidos e indiretamente pelo ânion superóxido. A oxidação transforma o DCF na forma livre que é retido apenas dentro de células com membrana intacta emitindo uma fluorescência de coloração verde amarelada (HARRISON; VICKERS, 1990; DALVIT et al., 2005).

2.6.4 Potencial mitocondrial

A mitocôndria é a organela sítio de produção da maior parte da energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), utilizada no metabolismo celular. Além de se mensurar a atividade mitocondrial pela quantidade ATP produzida, é possível avaliar o potencial da membrana interna mitocondrial como indicador de processos fisiológicos e patológicos em que esta está envolvida (BLERKOM et al., 2003).

O potencial da membrana mitocondrial está associado à capacidade da mitocôndria em bombear prótons de sua matriz para o espaço intermembranas. Isso se dá através da energia livre gerada pelo transporte de elétrons, durante o processo de fosforilação oxidativa, criando gradiente eletroquímico (CHEN, 1988). Em condições fisiológicas normais, há uma liberação ativa de prótons pela respiração e consumo passivo destes durante a síntese de ATP pela ATP sintetase (BARACCA, 2003).

A disfunção mitocondrial pode ser um evento inicial no processo apoptótico, uma vez que, a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induz a despolarização do potencial de membrana havendo perda na fosforilação oxidativa e liberação de fatores apoptogênicos. No entanto, alguns estudos sugerem que a perda de potencial de membrana das mitocôndrias seja uma consequência da via de sinalização apoptótica e não um requisito inicial (GOTTLIEB et al., 2003; LY et al., 2003). Estudo realizado com camundongos e humanos mostraram que os embriões com mitocôndrias de baixo potencial de membrana podem apresentar disfunções no transporte de elétrons durante a síntese de ATP e na integridade da membrana mitocondrial prejudicando o desenvolvimento embrionário (ACTON, 2004).

Na avaliação do potencial de membrana mitocondrial é observada a eficiência do transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos, assim a membrana interna atua como um sistema polarizado com cargas negativas onde os corantes lipofílicos se ligam (MIRANDA, 2005). Para isso alguns marcadores podem ser utilizados, como a Rodamina123, o Mito Tracker Green FM e o JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina).

A sonda JC-1 destaca-se por não possuir ligações inespecíficas e pela maior sensibilidade quando comparado às sondas Mito Tracker Green e Rodamina 123. O JC-1 é um corante metacromático, ou seja, as suas propriedades fluorescentes variam de acordo com o potencial mitocondrial, assim, mitocôndrias com baixo potencial da membrana emitem

fluorescência verde e revela uma fluorescência vermelha quando o potencial mitocondrial é alto (GARNER et al., 1997; CELEGHINI et al., 2007).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de a PIVE apresentar números expressivos na espécie bovina, as taxas de produtividade não ultrapassam 40% e a qualidade embrionária continua inferior a dos embriões produzidos *in vivo* (LONERGAN; FAIR, 2008). Dentre os aspectos a serem melhorados para elevação das taxas de produção *in vitro*, está a elaboração de meios e sistemas que mimetizem o ambiente fisiológico natural. *In vivo*, a concentração intrafolicular e sérica de hormônios, fatores de crescimento, citocinas e proteínas como a Kp suprem as necessidades para o completo desenvolvimento e proliferação celular. Neste contexto, o efeito destas substâncias vem sendo estudado com a finalidade de aumentar os índices de produtividade desta biotécnica.

A Kp atua como principal regulador do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e tem sido estudada em suas diversas formas e sítios de atuação na reprodução animal. Além de ser fundamental para o início da puberdade, a Kp também participa do processo de implantação de embriões e recrutamento folicular durante o envelhecimento ovariano. A presença de seu receptor (KISS1R) já foi demonstrada no hipotálamo, hipófise, placenta, útero, células da teca, células da granulosa, ovócito, corpo lúteo e células intersticiais (HSU et al., 2014; HE et al., 2015; FERNANDOIS et al., 2016).

É comprovado que meios preparados com suplementação proteica aumentam as taxas de blastocistos além de permitirem a realização de experimentos em fases definidas durante a produção *in vitro*. Taxas de maturação ovocitária elevadas associadas ao uso da Kp foram reportadas anteriormente em suínos, bovinos e ovinos (SAADELDIN et al.; 2012; OLIVEIRA et al.; 2016; BURY et al.; 2017). Entretanto ainda não há pesquisas que abordem o efeito da adição da Kp no meio de FIV e no desenvolvimento embrionário inicial.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição de Kp no meio de fertilização *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.

4.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito da adição de Kp e seu antagonista nas taxas de clivagem e produção de blastocistos.
- b) Verificar a influência da Kp no estágio de desenvolvimento embrionário inicial.
- c) Avaliar a qualidade embrionária quanto à produção de ROS, degeneração, apoptose e potencial mitocondrial.

5 HIPÓTESES

- a) A suplementação com Kp no meio de FIV proporciona maior taxa de produção embriões viáveis em relação ao grupo controle e grupo antagonista.
- b) A Kp influencia positivamente no estágio de desenvolvimento embrionário.
- c) A adição de Kp no meio FIV melhora a qualidade dos embriões.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia-MG, sendo considerado isento de avaliação (Protocolo nº A005/2017), por se tratar de pesquisa que utiliza órgãos de animais domésticos obtidos de abatedouro.

6.2 Reagentes

Os reagentes utilizados na execução deste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma. A Kp-10 murina (YNWNSFGLRY-NH₂) e o seu antagonista P-234 (d-Ala-Asn-Trp-Asn-Gly-Phe-Gly-D-Trp-Arg-Phe) foram sintetizados pela empresa GenScript Biotech (Nova Jersey, EUA), ambos com 98% de pureza. O FSH (Folltropin[®]) e o LH (Lutropin-V[®]) foram fabricados pela Bioniche Inc., (Belleville, Canadá) e os corantes JC-1 e YO-PRO foram adquiridos da empresa Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

6.3 Delineamento experimental

Experimento 1

Para determinar a quantidade mínima de Kp a ser utilizada no meio TALP-FERT, foram cultivados 933 ovócitos maturados foram distribuídos aleatoriamente para compor os diferentes tratamentos com as seguintes concentrações: Kp 10⁻⁷ M (n=245), Kp 10⁻⁶ M (n=225) e Kp 10⁻⁵ M (n=223), além do grupo controle (n=240) (SAADELDIN et al., 2012; SOARES et al., 2018). Foram avaliadas taxas de clivagem e blastocisto de 30 réplicas (Figura 2).

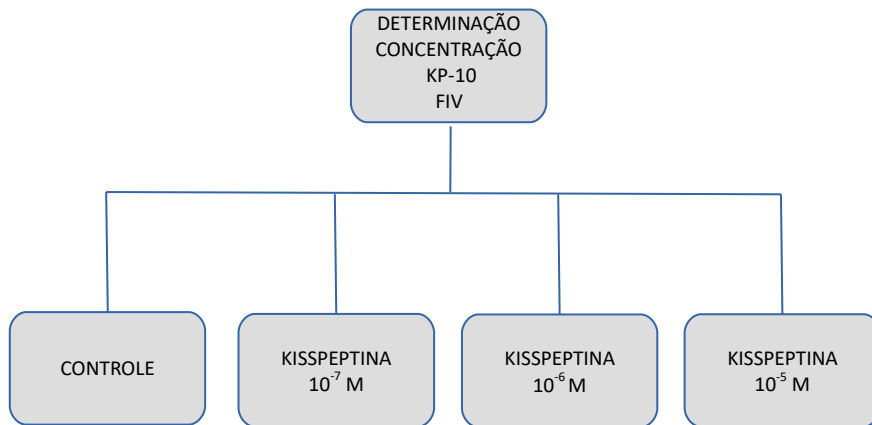


Figura 2. Experimento 1 - Avaliação da quantidade mínima de Kp-10 para a fertilização.

Experimento 2

De posse da concentração mínima de Kp (10^{-7} M) a ser suplementada na FIV, foram utilizados 1.515 ovócitos distribuídos nos seguintes tratamentos: controle (n=362), Kp a 10^{-7} M (n=304) e 10^{-1} M (n=425) (estabelecida como concentração máxima) e controle negativo com o antagonista P234 na concentração de 4×10^{-6} M (n=424) (SAADELDIN et al., 2012). Nesse segundo Experimento foram avaliadas taxas de clivagem e de blastocisto e os níveis de ROS, apoptose, necrose e potencial mitocondrial (Figura 3).

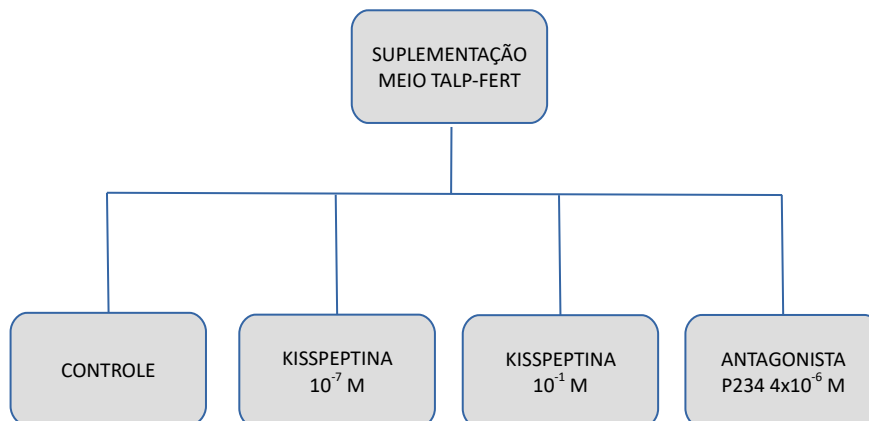


Figura 3. Experimento 2 - Suplementação com Kp-10 em meio de fertilização.

6.4 Coleta e seleção dos complexos cumulus-ovócitos

Ovários bovinos provenientes de abatedouro local foram transportados para o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia em recipiente térmico com temperatura entre 35°C e 38°C , não ultrapassando um período de quatro horas a

partir do abate. Imediatamente após a chegada ao laboratório os ovários foram lavados com solução salina 0,9% estéril e acondicionados em banho-maria a 37°C.

Folículos de diâmetro entre 3-8 mm foram aspirados utilizando agulha 18G acoplada em seringa de 5 ml, e o fluido folicular foi depositado em tubos plásticos de 15ml e mantido em banho-maria a 37°C por 10 minutos para sedimentação. Os pellets formados foram transferidos para placas de Petri contendo PBS acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 10% e avaliados sob microscópio estereoscópico (Olympus Optical[®], modelo SZ-40/SZ-ST) para rastreamento dos complexos cumulus-ovócito (COCs).

Os COCs foram avaliados quanto à aparência do citoplasma e das células do cumulus e classificados em Grau I (núcleo e citoplasma homogêneo e com mais de três camadas de células do cumulus compactas) e Grau II (COCs compactos com três ou menos camadas de células do cumulus ou ovócito com citoplasma levemente heterogêneo), Grau III (menos de duas camadas de células do cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e citoplasma homogêneo ou heterogêneo) (LEIBFRIED; FIRST, 1979). Por possuírem uma melhor relação ooplasma-cumulus, somente os COCs Grau I e Grau II foram selecionados para maturação.

6.5 Maturação *in vitro* (MIV)

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem (Base TCM-199 Hepes acrescida de 10% de soro fetal bovino, solução de piruvato 0,11 mg/mL e amicacina 83 mg/mL), uma vez em meio de maturação (TCM-199 Bicarbonato acrescida de 10% de soro fetal bovino, piruvato de sódio 22 µg/mL, amicacina 83 mg/mL, FSH 0,5 µg/mL e LH 5 µg/mL), os ovócitos foram distribuídos em gotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral e incubados a 38,5°C, sob atmosfera úmida a 5% de CO₂ por 22 a 24 horas. Após a maturação os ovócitos foram distribuídos aleatoriamente para compor os grupos experimentais.

6.6 Fertilização *in vitro* (FIV)

Para a fertilização foram utilizadas doses de sêmen de um touro comercializadas por empresa do ramo e com fertilidade comprovada em rotinas de FIV. Os espermatozoides foram selecionados por um de gradiente descontínuo de Percoll[®], adaptado de Parrish et al. (1995), composto por uma camada de Percoll[®] 45% contendo 0,5ml de meio TALP-SPERM

acrescido de amicacina 83 mg/mL e solução de piruvato 0,11 mg/mL e 0,5ml de Percoll[®] 90%. Dessa forma, 1 mL de cada solução de Percoll[®] (45% e 90%) foi adicionado em tubo de 15 mL. Em seguida, uma dose de sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos, e após análise prévia de motilidade e vigor, foi cuidadosamente depositada sobre o gradiente de Percoll[®] e submetida à centrifugação a 1096 xg, por 30 minutos. Do sedimento formado foram utilizadas alíquotas de 5 µL para avaliação da motilidade, vigor e concentração, realizada por contagem de células em câmara de Neubauer sob microscópio de luz, a qual foi ajustada para 1×10^6 spz/mL. A dose inseminante foi fixada em 4 µL.

Os ovócitos maturados foram lavados duas vezes em meio TALP-FERT (acrescido de amicacina 83 mg/mL, solução de piruvato 0,11 mg/mL, PHE, heparina, Albumina Sérica Bovina (BSA)) livre de ácidos graxos essenciais 6 mg/mL e foram transferidos para gotas de 100µL de meio TALP-FERT cobertas com óleo mineral de acordo com cada tratamento. Após adição da dose inseminante foram incubados por 16 a 18 horas a 38,5°C, sob atmosfera úmida a 5% de CO₂.

6.7 Cultivo *in vitro* (CIV)

Transcorrido até 18h após a fecundação, os possíveis zigotos tiveram as células do cumulus removidas por pipetagens consecutivas e após três lavagens em meio com base SOF (suplementado com solução de piruvato 0,11mg/mL, amicacina 83 mg/mL, BSA livre de ácidos graxos e baixa endotoxina 6 mg/mL e soro fetal bovino 2,5%), foram distribuídos, em gotas de 100µL do mesmo meio sob óleo mineral e foram incubados durante sete dias a 38,5°C, sob atmosfera úmida a 5% de CO₂. A taxa de clivagem foi avaliada 48h após a fertilização e a taxa de blastocistos no sétimo dia. Os blastocistos foram classificados de acordo com a morfologia, obedecendo aos critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (IETS, 1998). Foi adotado um escore numérico de 1 a 4 para avaliação do estágio de desenvolvimento, onde 1 corresponde a blastocisto inicial, 2 blastocisto, 3 blastocisto expandido e 4 blastocisto eclodido.

6.8 Avaliação da qualidade embrionária

Para a avaliação da qualidade dos embriões, 30 blastocistos de cada tratamento foram corados com sondas fluorescentes. Para tanto, após o cultivo, os blastocistos foram lavados três vezes em solução PBS acrescido de SFB (1%) e foram divididos em três grupos. Um grupo de blastocistos foi incubado por 30 minutos a 37°C em 100µl do mesmo meio contendo 5µM de 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma Aldrich, DCF, H₂DCDFA, D6883), para marcar o nível de ROS. Aos 15 minutos de incubação na solução com DCF, foi acrescentado 125 µg/ml de iodeto de propídeo (Sigma Aldrich, P4170), para identificação do índice de degeneração celular. O segundo grupo de blastocistos foi corado com JC-1 (Invitrogen, Molecular Probs, T3168) por 10 minutos a 37°C na concentração de 1,2 µg/ml, para avaliar o potencial mitocondrial. O ultimo grupo de blastocistos foi separado para coloração com 10 µM/ml YO-PRO-1(Invitrogen, Molecular Probs, Y3603) durante 30 minutos na mesma temperatura para marcar as células em apoptose. Após as colorações todos os blastocistos foram lavados três vezes em PBS, fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos a 37°C, lavados novamente em gotas contendo solução de PBS e colocados em lâmina de vidro adicionando uma gota do meio de montagem Fluoroshield TM com DAPI (Sigma Aldrich, F6057), coberta por uma lamínula, de modo que não comprimissem os blastocistos e foram estocadas ao abrigo da luz entre 4 e 8°C até o momento da avaliação. A avaliação foi realizada em microscópio de varredura a laser confocal LSM 510 meta (Laser Scanning Microscope 510 meta, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no aumento de 20x de acordo com as faixas de excitação/emissão de cada sonda: DCF 495/519nm; YO-PRO-1 491/509nm; iodeto de propídeo 543/616 nm; JC-1 485/530 nm.

Para medir a intensidade de fluorescência dos embriões foi utilizado o *software* Zen 2.3 Lite. Cada embrião foi avaliado em Z stack 3D e gerou de 3 a 8 imagens. Cada imagem teve o embrião e uma área do fundo delimitados e gerados, separadamente, a intensidade de fluorescência em pixels, em seguida foi realizada a subtração do valor encontrado no embrião pelo valor encontrado no fundo, a fim de retirar a interferência do fundo na análise.

6.9 Análise estatística

Os dados contínuos foram testados quanto à homogeneidade de variâncias e homocedasticidade pelo procedimento UNIVARIATE. A fim de determinar o efeito dos tratamentos nas variáveis taxa de clivagem, blastocisto e estágio de desenvolvimento, os dados foram analisados pelo procedimento GLIMMIX do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Referente à qualidade embrionária, os dados de intensidade de

fluorescência não apresentaram distribuição normal. Dessa forma, os dados das variáveis dependentes não paramétricas foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis através do procedimento NPAR1WAY do SAS. Os valores são apresentados em porcentagem ou média \pm EPM (Erro Padrão da Média) e a significância estatística foi estabelecida como $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

Experimento 1

Foram cultivados 933 ovócitos e foram produzidos 280 embriões, dos quais foram avaliadas as taxas de clivagem e blastocisto para os quatro tratamentos. Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) para taxas de clivagem e produção de blastocistos (Tabela 1). Adicionalmente, não houve interação tratamento x réplica ($P = 0,11$).

Tabela 1. Taxas de clivagem e de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com diferentes concentrações de Kp (Controle, Kp 10^{-5} M, Kp 10^{-6} M, Kp 10^{-7} M) no meio TALP-FERT.

TRATAMENTO	CLIVAGEM/EP* (%)	BLASTOCISTO/EP* (%)
Controle	82,0 ± 2,4 (197/240)	34,2 ± 3,1 (82/240)
Kp 10^{-5} M	81,6 ± 2,5 (182/223)	26,9 ± 3,0 (60/223)
Kp 10^{-6} M	80,8 ± 2,6 (182/225)	29,3 ± 3,0 (66/225)
Kp 10^{-7} M	80,8 ± 2,5 (196/245)	29,4 ± 2,9 (72/245)

*EP = Erro Padrão

*Valores considerados estatisticamente quando $P < 0,05$.

Experimento 2

Foram utilizados 1.515 ovócitos e produzidos 514 embriões, distribuídos em quatro tratamentos. Como não houve diferença entre as diferentes concentrações de Kp testadas no experimento 1, a Kp (10^{-7} M) foi definida como a concentração mínima a ser suplementada no meio TALP-FERT. As taxas de clivagem e blastocistos obtidos com a adição de kp-10 nas concentrações de 10^{-1} e 10^{-7} M e seu antagonista P234 a 4×10^{-6} M, são apresentados na Tabela 2. As taxas de clivagem e de blastocistos foram semelhantes entre os tratamentos ($P > 0,05$) e não houve interação tratamento x réplica ($P = 0,78$).

Tabela 2. Taxas de clivagem e blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com Kp e seu antagonista (Controle, Kp 10^{-1} M, Kp 10^{-7} M, P234 4×10^{-6} M) no meio TALP-FERT.

TRATAMENTO	CLIVAGEM/EP* (%)	BLASTOCISTO/EP* (%)
Controle	85,1 ± 1,9 (308/362)	38,1 ± 2,6 (138/362)
Kp 10^{-1} M	82,6 ± 1,8 (351/425)	33,6 ± 2,3 (142/425)
Kp 10^{-7} M	83,6 ± 2,1 (254/304)	34,9 ± 2,7 (106/304)

P234 4×10^{-6} M	$81,4 \pm 1,9$ (345/424)	$31,6 \pm 2,3$ (134/424)
---------------------------	--------------------------	--------------------------

*EP = Erro Padrão

*Valores considerados estatisticamente quando $P < 0,05$.

Os embriões produzidos foram avaliados em escore de 1 a 4 para o estágio de desenvolvimento. Todos os tratamentos apresentaram um escore entre 2,6 e 3,1, sem diferença entre os mesmos ($P > 0,05$), no entanto ao fazer comparação entre as médias, observou-se uma tendência entre os tratamento Kp 10^{-1} M e P234 (Figura 4).

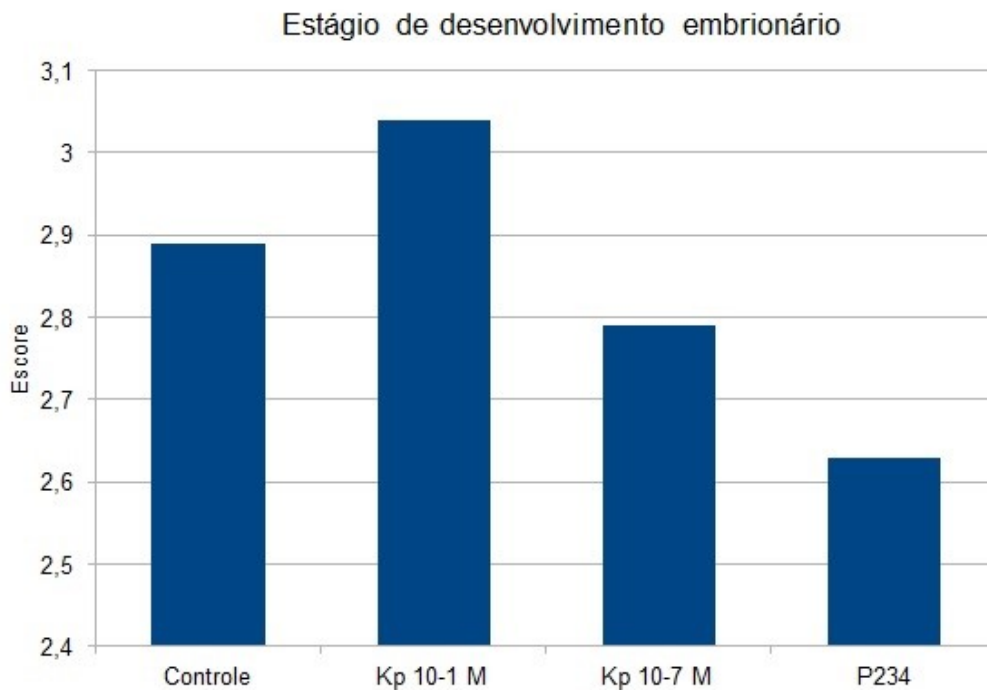


Figura 4. Escores do estágio de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes concentrações de Kp no meio TALP-FERT.

Para análise da qualidade embrionária foram avaliados 360 embriões, $n=30$ / tratamento/ corante. Os parâmetros de qualidade observados foram produção de ROS, necrose, apoptose e potencial mitocondrial (Figura 5). Na avaliação por microscopia confocal 3D, cada embrião forneceu de 3 a 8 imagens ($n=1.492$) com intensidade de fluorescência em pixels.

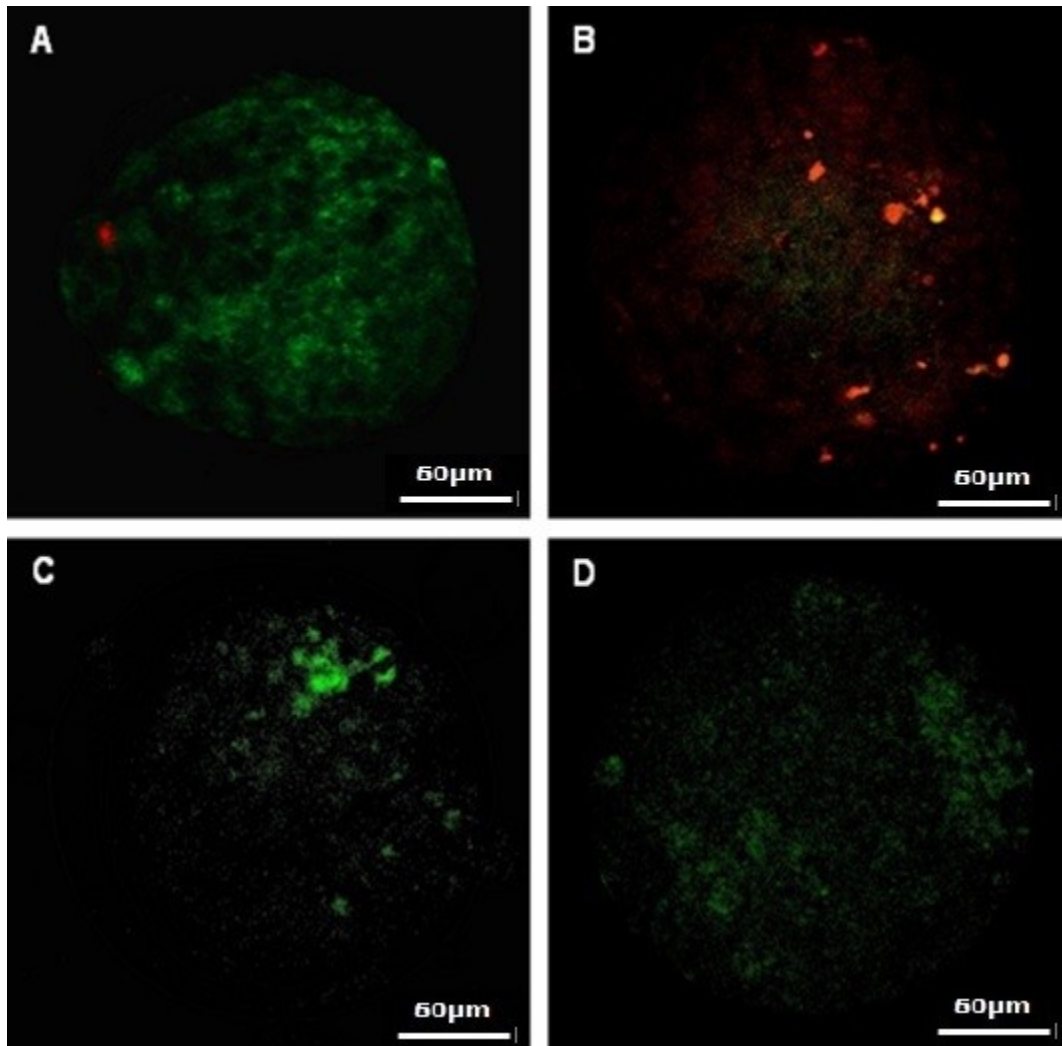


Figura 5. Fotomicrografia de epifluorescência de blastocistos corados com DCF associado à IP, YO-PRO-1 e JC-1 (aumento 20x). A) Blastocisto cultivado em meio TALP-FERT sem adição de Kp e com alto nível de ROS; B) Blastocisto cultivado em meio TALP-FERT com Kp 10^{-7} M em processo de degeneração celular; C) Blastocisto cultivado em meio TALP-FERT com P234 4×10^{-6} M apresentando concentração de células apoptóticas em um dos polos. D) Blastocisto cultivado em meio TALP-FERT com Kp 10^{-1} M e com baixo potencial mitocondrial.

Baseado nos valores de intensidade encontrados para o DCF, os níveis intracelulares de ROS variaram entre os tratamentos ($P < 0,05$; Tabela 3). O grupo controle apresentou maior intensidade de DCF em relação aos demais grupos. Foi observado que ao aumentar a concentração de Kp no meio, menor intensidade de fluorescência era encontrada.

Tabela 3. Porcentagem média do nível de espécies reativas de oxigênio de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* de acordo com os tratamentos Controle, Kp 10⁻¹ M, Kp 10⁻⁷ M e P-234.

TRATAMENTO	MÉDIA/EPM (%)
Controle	3,76 ± 1,01 c
Kp 10 ⁻¹ M	0,25 ± 0,04 a
Kp 10 ⁻⁷ M	2,95 ± 1,26 bc
P234 4x10 ⁻⁶ M	0,91 ± 0,23 b

*EPM = Erro Padrão da Média

* a,b,c,d Letras diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05).

O nível de degeneração celular foi semelhante entre os tratamentos (P > 0,05; Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem média do índice de degeneração celular em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* nos tratamentos Controle, Kp 10⁻¹ M, Kp 10⁻⁷ M e P-234.

TRATAMENTO	MÉDIA/EPM (%)
Controle	1,51 ± 0,24 a
Kp 10 ⁻¹ M	1,73 ± 0,25 ab
Kp 10 ⁻⁷ M	4,71 ± 1,66 b
P234 4x10 ⁻⁶ M	1,98 ± 0,33 ab

*EPM = Erro Padrão da Média

* a,b,c,d Letras diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05).

Não foi detectado efeito de tratamento no índice de apoptose celular nos blastocistos avaliados (P > 0,05; Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem média do índice de apoptose celular em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* nos tratamentos Controle, Kp 10⁻¹ M, Kp 10⁻⁷ M e P-234.

TRATAMENTO	MÉDIA/EPM (%)
Controle	2,79 ± 0,97
Kp 10 ⁻¹ M	1,69 ± 0,58
Kp 10 ⁻⁷ M	1,67 ± 0,63
P234 4x10 ⁻⁶ M	6,11 ± 2,44

*EPM = Erro Padrão da Média

* a,b,c,d Letras diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05).

Em relação ao potencial mitocondrial, o grupo suplementado com P234, apresentou maior intensidade de fluorescência que os demais grupos.

Tabela 6. Porcentagem média do índice de potencial de membrana mitocondrial em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* nos tratamentos Controle, Kp 10^{-1} M, Kp 10^{-7} M e P-234.

TRATAMENTO	MÉDIA/EPM (%)
Controle	0,51 ± 0,26 a
Kp 10^{-1} M	0,26 ± 0,06 a
Kp 10^{-7} M	0,22 ± 0,08 a
P234 4×10^{-6} M	1,43 ± 0,52 b

*EPM = Erro Padrão da Média

* a,b,c,d Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

8 DISCUSSÃO

A composição dos meios utilizados na PIVE tem grande influência nas taxas de produção e na qualidade dos embriões. Diante disso, no presente estudo avaliou-se o efeito da suplementação de Kp-10 e seu antagonista em meios de fertilização sobre as taxas de produção e qualidade embrionária.

No Experimento 1, a adição de diferentes concentrações de Kp-10, não influenciou as taxas de clivagem e de produção de blastocistos. Além disso, os resultados se comportaram de forma semelhante nas diferentes réplicas. Durante a fase de fertilização a suplementação com Kp-10 não promoveu efeito no aumento das taxas de produção embrionárias. Este resultado pode ser explicado pela diminuição da expressão da Kp, observada no período de 12-24h de maturação *in vitro*, ou seja, há um declínio na expressão de Kp e conseqüentemente de receptores ao término da MIV (HE et al., 2015). Da mesma forma, Owens et al. (2018) não evidenciaram a ativação do receptor de Kp em células da granulosa após administração *in vitro* de Kp-10 e Kp-54, em diferentes concentrações e períodos de tempo. Por outro lado, estudo anterior reportou que a utilização de Kp-10 na concentração de 10^{-7} M, na fase de fertilização aumentou as taxas de produção embrionária (SOARES et al., 2018).

No segundo Experimento a suplementação de kp-10 e seu antagonista P234 no meio de fertilização não interferiu nas taxas de clivagem e blastocistos, bem como no grau de desenvolvimento embrionário. Assim como no Experimento 1 os resultados se comportaram de forma semelhante nas diferentes réplicas. A adição de altas concentrações de kp-10 (10^{-1} M) durante a fase de fertilização não demonstrou nenhum tipo de efeito sobre as taxas de produção embrionária possivelmente associado à presença reduzida de receptores (HE et al., 2015). Em suínos, células da granulosa cultivadas em meios suplementados com kp-10 e seu antagonista P234 não tiveram a sua viabilidade e proliferação modificadas (BASINI et al., 2018). Dessa forma, pode-se sugerir que a ausência ou o bloqueio da Kp durante a fase de fertilização *in vitro*, não interfere na produção de embriões.

A avaliação do estágio de desenvolvimento embrionário constatou que a maioria dos blastocistos produzidos se encontrava entre os estágios de blastocisto e blastocisto expandido, porém sem nenhuma evidência de que a suplementação de Kp-10 e P234 exercessem influência no estágio de desenvolvimento embrionário. Com um desenvolvimento adequado, a estimativa de idade esperada para a fase blastocística em bovinos é de 7 a 9 dias até a sua eclosão (LINDNER, WRIGHT, 1983), nessa fase, é observada a expansão da cavidade blastocística com o embrião ocupando de 70 a 80% do espaço perivitelínico, também é possível diferenciar o trofoblasto da

massa celular interna. Durante o estágio de blastocisto expandido, a cavidade blastocística pode estar completamente ausente e a espessura da zona pelúcida encontra-se reduzida, quando esta se rompe o blastocisto é liberado (LINDNER, WRIGHT, 1983; MOORE, PERSAUD, 2004). No sistema *in vitro*, os embriões são coletados para transferência preferencialmente no 6º e 7º dias na fase de blastocisto. Assim embriões em estágio de desenvolvimento incompatível com o momento da coleta podem comprometer o desenvolvimento pós-transferência (VIANA, 2009). Embora a Kp não tenha influenciado no estágio de desenvolvimento, a maior incidência de embriões em estágios de desenvolvimento dentro do que é esperado para o período de sete dias, indica que o sistema de cultivo adotado neste experimento foi eficiente.

Estudos têm demonstrado diversas formas de atuação da Kp no cultivo de células e tecido de diferentes espécies (XIAO et. al., 2011; CHIANESE et. al., 2015; LIU et al., 2017). Neste trabalho a adição de Kp em alta concentração (Kp 10^{-1} M) no meio TALP-FERT, diminuiu os níveis intracelulares de ROS, sugerindo o seu envolvimento no controle antioxidante. Resultado semelhante foi encontrado por BASINI et al., (2018), ao observarem aumento na atividade de eliminação não enzimática (antioxidante) em células da granulosa de folículos ovarianos suínos, quando estas eram cultivadas com KP 100nM (10^{-7} M), além disso, a Kp não interferiu na produção de O_2^- . O O_2^- que é um dos principais ROS gerado no cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Quando a quantidade de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, lesões no DNA podem ocorrer e comprometer a qualidade dos embriões produzidos (ANDRADE et. al., 2010). Portanto, aumentar a disponibilidade de antioxidantes é uma das formas de compensar esse desequilíbrio. Nesse sentido, a adição de Kp foi eficiente no controle de ROS.

Quanto à degeneração celular, não foi observada diminuição da viabilidade dos embriões tratados com Kp, estes apresentaram intensidade de fluorescência do IP semelhantes quando comparados ao controle. Resultados encontrados por LIU et. al., (2017), ao utilizarem diferentes concentrações de Kp, verificaram que células da granulosa de bovinos tratadas com Kp 10^{-7} M, tiveram a sua viabilidade significativamente inibida. Por outro lado, resultado divergente foi obtido por XIAO et. al., (2011), ao avaliarem o efeito da Kp na viabilidade de células da granulosa de galinhas, foi observado aumento na viabilidade celular quando cultivadas com Kp 100nM. Em contrapartida, neste trabalho, o grupo tratado com maior concentração de Kp (10^{-1} M), teve o nível de intensidade semelhante ao controle e P234. Outro estudo reportou, que células epiteliais primárias isoladas de cotilédones placentários de embriões bovinos não tiveram a sua viabilidade influenciada pela Kp no cultivo *in vitro*, foi observado ainda que os efeitos nessa linhagem celular não eram dose dependentes (MARTINO et. al., 2015). A permeabilidade do corante está relacionada

à presença de blastômeros com membrana danificada, nos quais mudanças irreversíveis são observadas no núcleo e no citoplasma predizendo a morte celular (MAJNO; JORIS, 1995).

Os níveis de intensidade de fluorescência detectados pelo YO-PRO-1 foram semelhantes nos quatro tratamentos, ou seja, a Kp não interferiu na apoptose, durante a fertilização *in vitro*. Por outro lado, SAADELDIN et al. (2012) e LIU et. al. (2017), reportaram que a Kp promoveu aumento da expressão de genes pró-apoptóticos em blastocistos e células da granulosa em bovinos, respectivamente. Em bovinos, a maior atividade apoptótica é encontrada nos estágios de mórula e blastocisto, fases que coincidem com a ativação do genoma embrionário (oito a 16 células). Nesse período a apoptose contribui para o controle da proliferação celular (FREI et al., 1989; GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). Dessa forma, embasado no fato de que o aumento do metabolismo ocorrer após a primeira clivagem juntamente com os resultados encontrados neste trabalho, é possível inferir que a adição de Kp não tem efeito sobre a apoptose durante a fertilização.

No presente estudo, a Kp não influenciou o potencial mitocondrial, quando comparada ao controle. Entretanto, os embriões que foram fertilizados em meio com antagonista P234 apresentaram maior intensidade de fluorescência. Resultado divergente foi encontrado por SOARES, (2018), ao reportar a diminuição do potencial mitocondrial em células espermáticas capacitadas em meio suplementado com P234 a 5×10^{-5} M. Por outro lado, células do câncer de mama, cultivadas com Kp-10 tiveram perda no potencial de membrana mitocondrial e diminuição na expressão de genes antiapoptóticos (SONG; ZHAO, 2016). Inclusive, o baixo potencial mitocondrial pode ser um dos primeiros eventos do processo apoptótico (LY et. al., 2003). Nesse sentido, como as mitocôndrias são o sítio de produção da maior parte da energia utilizada na forma de ATP pelo metabolismo celular, o baixo potencial mitocondrial pode prejudicar o desenvolvimento embrionário (ACTON, 2004). Como descrito anteriormente, a Kp não teve influência nos níveis de células apoptóticas, da mesma forma, não foi observado o seu efeito no potencial mitocondrial, sugerindo uma relação entre esses resultados.

Os resultados obtidos neste e em vários outros trabalhos tem demonstrado que a atuação da Kp, não se resume a apenas a regulação do eixo reprodutivo. Papéis adicionais da Kp em tecidos reprodutivos periféricos têm sido sugeridos em diversas espécies.

9 CONCLUSÃO

A adição de Kp-10 na fase de fertilização *in vitro* não interferiu nas taxas de produção e no estágio de desenvolvimento embrionário. A Kp-10 diminuiu os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, confirmando sua ação também como antioxidante. O potencial mitocondrial, a apoptose e a degeneração celular não foram influenciados pela Kp. A presença do antagonista P234 no meio de fertilização aumentou o potencial mitocondrial.

REFERÊNCIAS

- ABASTADO, J. P. Apoptosis: function and regulation of cell death. **Research in immunology**, v. 147, n. 7, p. 443-456, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0923-2494\(97\)84409-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2494(97)84409-4)
- ACTON, B. M.; JURISICOVA, A.; JURISICA, I.; CASPER, R. F. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 10, n. 1, p. 23-32, 2004. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah004>
- ADONA, P. R. **Efeitos morfológicos, bioquímicos e moleculares do bloqueio meiótico em ovócitos bovinos sobre a produção *in vitro* de embriões**. Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006, 78p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)- Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Norte Fluminense, 2006.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, 2005. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- AHMED, A. E.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; YAMASHITA, T.; HIRATA, T. I., ... & HASHIZUME, T. Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 6, p. 650-654, 2009. <https://doi.org/10.1262/jrd.20255>
- ALI, A.; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 901-905, 2002. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.901>
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- BARACCA, A.; SGARBI, G.; SOLAINI, G.; LENZA, G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1606, n. 1-3, p. 137-146, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00110-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00110-5)
- BASINI, G.; GRASSELLI, F.; BUSSOLATI, S.; CICCIMARRA, R.; MARANESI, M.; BUFALARI, A.; PARILLO, F.; ZERANI, M. Presence and function of kisspeptin/KISS1R system in swine ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 115, p. 1-8, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.006>
- BILBAN, M.; GHAFARI-TABRIZI, N.; HINTERMANN, E.; BAUER, S.; MOLZER, S.; ZORATTI, C., ... & KNÖFLER, M. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. **Journal of cell science**, v. 117, n. 8, p. 1319-1328, 2004. <https://doi.org/10.1242/jcs.00971>

- BIRAN, J; BEN-DOR, S; LEVAVI-SIVAN, B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 4, p. 776-786, 2008. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066266>
- BLERKOM, J.V.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. ALEXANDER, Samuel. Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes. **Human Reproduction**, v. 18, n. 11, p. 2429-2440, 2003. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg466>
- BOONE, W.R.; SHAPIRO, S.S. Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory. **Theriogenology**, v.33, p.23-50, 1990. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90595-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90595-K)
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>
- BUHI, W.C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 355-362, 2002. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230355>
- BYRI, P.; GANGINENI, A.; REDDY, K. R.; RAGHAVENDER, K. B. P. Effect of kisspeptin on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Veterinary world**, v. 10, n. 3, p. 276, 2017. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.276-280>
- CARATY, A.; SMITH, J. T.; LOMET, D.; BEN SAID, S.; MORRISSEY, A.; COGNIE, J.; CLARKE, I. J. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. **Endocrinology**, v. 148, n. 11, p. 5258-5267, 2007. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0554>
- CARTWRIGHT, J. E.; WILLIAMS, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. **Journal of Endocrinology**, p. JOE-12-0091, 2012. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0091>
- CASTAÑO, J. P.; MARTÍNEZ-FUENTES, A. J.; GUTIÉRREZ-PASCUAL, E.; VAUDRY, H.; TENA-SEMPERE, M.; MALAGÓN, M. M. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 10-15, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.025>
- CASTELLANO, J. M.; NAVARRO, V. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; CASTANO, J. P.; MALAGON, M. M.; AGUILAR, E.; ... & TENA-SEMPERE, M. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 257, p. 75-83, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.07.002>
- CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v. 184, n. 4684, p. 466, 1959.
<https://doi.org/10.1038/184466a0>

CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential in living cells. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual review of cell biology**, v. 4, n. 1, p. 155-181, 1988.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001103>

CHIANESE, R.; CIARAMELLA, V.; FASANO, S.; PIERANTONI, R.; MECCARIELLO, R. Kisspeptin drives germ cell progression in the anuran amphibian *Pelophylax esculentus*: a study carried out in ex vivo testes. **General and comparative endocrinology**, v. 211, p. 81-91, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.11.008>

CIELESH, M. E.; MCGRATH, B. M.; SCOTT, C. J.; NORMAN, S. T.; STEPHEN, C. P. The localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the canine ovary during different stages of the reproductive cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 24-28, 2017.
<https://doi.org/10.1111/rda.12841>

CLARKSON, J.; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; HERBISON, A. E. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. **Journal of neuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 673-682, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x>

CLARKSON, J.; HERBISON, A.E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5817-5825, 2006. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0787>

DALVIT, G.C; CETICA, P.D; PINTOS,L.N; BECONI, M.T. Reactive oxygen species in bovine embryo *in vitro* production. **Biocell**, v. 29, n. 2, p. 209-212, 2005. ISSN 0327-9545

DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 181-185, 2000.

DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J. C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J. L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10972-10976, 2003.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100>

DHILLO, W. S.; CHAUDHRI, O. B.; PATTERSON, M.; THOMPSON, E. L.; MURPHY, K. G.; BADMAN, M. K.; ... & BLOOM, S. R. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 12, p. 6609-6615, 2005. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1468>

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.;HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMAN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 5-20, 2002.

DINIZ E.G.; ESPER C.R.; JACOMINI J.O.; VIEIRA R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.70-76, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000100010>

DOS SANTOS JUNIOR, E. R.; CHAVES, R. M.; DA SILVA, J. C. F.; MOURA, M. T.; BARTOLOMEU, C. C.; GONÇALVES, P. B. D., ... & OLIVEIRA, M. A. L. Avaliação de embriões ovinos provenientes de oócitos submetidos a estresse calórico durante a maturação *in vitro*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 360-365, 2013.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 55-79, 1991. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90148-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90148-7)

ECHEVERRÍA, R.S.; ROBLES, R.C.C.; ÁVILA, H.R.V.; PERERA-MARÍN, G.; ARÉVALO, J.A.A.; NETT, T.M.; AGUILAR, C.G.; VILLA-GODOY, A. Luteinizing hormone and ovarian activity in response to kisspeptin-10 and its association with IGF-1 and leptin in prepubertal heifers. **Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria**, v.5, p.181-200, 2014.

ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966.

FERNANDOIS, D.; NA, E.; CUEVAS, F.; CRUZ, G.; LARA, H. E.; PAREDES, A. H. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. **Journal of Endocrinology**, v. 228, n. 3, p. 161-170, 2016. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0429>

FEUGANG, J. M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of β -mercaptoethanol or Trolox[®] at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 71-90, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00191-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00191-2)

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V.; Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed., Roca: São Paulo, 2008. p.303-327

FRANCESCHINI, I.; LOMET, D.; CATEAU, M.; DELSOL, G.; TILLET, Y.; CARATY, A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. **Neuroscience letters**, v. 401, n. 3, p. 225-230, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.039>

FREI, R.E; SCHULTZ, G.A; CHURCH, R.B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. **Journal of reproduction and fertility**, v. 86, n. 2, p. 637-641, 1989. <https://doi.org/doi:10.1530/jrf.0.0860637>

FUJISAWA, S.; ROMIN, Y.; BARLAS, A.; PETROVIC, L. M.; TURKEKUL, M.; FAN, N., ... & ERINJERI, J. P. Evaluation of YO-PRO-1 as an early marker of apoptosis following radiofrequency ablation of colon cancer liver metastases. **Cytotechnology**, v. 66, n. 2, p. 259-273, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9565-3>

FUNES, S.; HEDRICK, J. A.; VASSILEVA, G.; MARKOWITZ, L.; ABBONDANZO, S.; GOLOVKO, A.; ... & GUSTAFSON, E. L. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the

development of the murine reproductive system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 312, n. 4, p. 1357-1363, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.066>

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8)

GANDOLFI, T. B.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1255-1276, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00481-2)

GARDNER, D. K.; VELLA, P.; LANE, M.; WAGLEY, L.; SCHLENKER, T.; SCHOOLCRAFT, W. B. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. **Fertility and sterility**, v. 69, n. 1, p. 84-88, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00438-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00438-X)

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1401>

GAYTÁN, F.; GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J. M.; ROMERO, M.; ROA, J.; APARICIO, B.; ... & FRASER, H. M. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 3, p. E520-E531, 2009. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90895.2008>

GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J. M.; ROA, J.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; TENA-SEMPERE, M.; GAYTÁN, F. Expression of KiSS-1 in rat oviduct: possible involvement in prevention of ectopic implantation?. **Cell and tissue research**, v. 329, n. 3, p. 571-579, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0426-2>

GEORGE, J. T.; VELDHUIS, J. D.; ROSEWEIR, A. K.; NEWTON, C. L.; FACCENDA, E.; MILLAR, R. P.; ANDERSON, R. A. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 8, p. E1228-E1236, 2011. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0089>

GEORGE, J. T.; VELDHUIS, J. D.; TENA-SEMPERE, M.; MILLAR, R. P.; ANDERSON, R. A. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: Kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism. **Clinical endocrinology**, v. 79, n. 1, p. 100-104, 2013. <https://doi.org/10.1111/cen.12103>

GERENDAI, I.; TOTH, I.E.; BOLDOGKOI, Z.; MEDVECZKY, I.; HALASZ, B. Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral neuronal tracing technique. **Neuroendocrinology**, v. 68, n. 4, p. 244-256, 1998. <https://doi.org/10.1159/000054372>

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D.F. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 524-529, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.008474>

- GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R. e FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ed. São Paulo: Roca, 2008.
- GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 1, p. 68-74, 1996.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.68>
- GOODMAN, R. L.; JANSEN, H. T.; BILLINGS, H. J.; COOLEN, L. M.; LEHMAN, M. N. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. **Journal of neuroendocrinology**, v. 22, n. 7, p. 674-681, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02014.x>
- GORDON, I. Prenatal Development of the Bovine Ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: **New York, Raven Press**, p; 4349, 1994.
- GOTTLIEB, E.; ARMOUR, S. M.; HARRIS, M. H.; Thompson, C. B. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 10, n. 6, p. 709, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401231>
- GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 4-9, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.016>
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- HAN, S. K.; GOTTSCH, M. L.; LEE, K. J.; POPA, S. M.; SMITH, J. T.; JAKAWICH, S. K.; ... & HERBISON, A. E. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11349-11356, 2005. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005>
- HARDY, K.; STARK, J.; WINSTON, R.M.L. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1165-1169, 2003.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010090>
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880343>
- HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal reproduction science**, v. 98, n. 1, p. 113-128, 2007. ISSN 0378-4320.
- HASHIZUME, T.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; EZZAT, A. A.; SAWAI, K.; YAMASHITA, T. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. **Animal reproduction science**, v. 118, n. 1, p. 37-41, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.017>

HE, M.; WANG, J.; YANG, Y. J.; LIU, Z. W.; LIU, X., LV, W. F. Expression and function of kisspeptin during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Chinese Journal of Animal Science**, v. 11, p. 005, 2015.

HEIDER, U.; PEDAL, I.; SPANEL-BOROWSKI, K. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. **Fertility and sterility**, v. 75, n. 6, p. 1141-1147, 2001 [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)01805-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01805-2)

HERBISON, A. E.; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; DORAN, J.; COLLEDGE, W. H. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 312-321, 2010. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0552>

HIDEN, U.; BILBAN, M.; KNÖFLER, M.; DESOYE, G. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 1, p. 31-39, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11154-007-9030-8>

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. In: **International review of cytology**. Academic Press, 1991. p. 43-101. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)

HORIKOSHI, Y.; MATSUMOTO, H.; TAKATSU, Y.; OHTAKI, T.; KITADA, C.; USUKI, S.; FUJINO, M. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 914-919, 2003. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021235>

HRABOVSKY, E.; CIOFI, P.; VIDA, B.; HORVATH, M. C.; KELLER, E.; CARATY, A.; BLOOM, S.R.; GHATEI, M.A.; DHILLO, W.S.; LIPOSITS, Z.; KALLO, I. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin releasing hormone and neurokinin B neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 1984-1998, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07239.x>

HSU, M. C.; WANG, J. Y.; LEE, Y. J.; JONG, D. S.; TSUI, K. H.; CHIU, C. H. Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 835-845, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0368>

IRWIG, M. S.; FRALEY, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; POPA, S. M.; CUNNINGHAM, M. J.; ... ; STEINER, R. A. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 4, p. 264-272, 2004. <https://doi.org/10.1159/000083140>

JAYASENA, C. N.; ABBARA, A.; COMNINOS, A. N.; NIJHER, G. M.; CHRISTOPOULOS, G.; NARAYANASWAMY, S., ... & ASHBY, D. Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing *in vitro* fertilization. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 8, p. 3667-3677, 2014. <https://doi.org/10.1172/JCI75730>

KADOKAWA, H.; MATSUI, M.; HAYASHI, K.; MATSUNAGA, N.; KAWASHIMA, C.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. **Journal of Endocrinology**, v. 196, n. 2, p. 331-334, 2008. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0504>

KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J. M.; LE POUL, E.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S.N.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34631-34636, 2001.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M104847200>

LAOHARATCHATHANIN, T.; TERASHIMA, R.; YONEZAWA, T.; KURUSU, S.; KAWAMINAMI, M. Augmentation of metastin/kisspeptin mRNA expression by the proestrous luteinizing hormone surge in granulosa cells of rats: implications for luteinization. **Biology of reproduction**, v. 93, n. 1, p. 15, 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.127902>

LEE, J. H.; MIELE, M. E.; HICKS, D. J.; PHILLIPS, K. K.; TRENT, J. M.; WEISSMAN, B. E.; WELCH, D. R. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–7, 1996.

<https://doi.org/10.1093/jnci/88.23.1731>

LEE; D.K.; NGUYEN, T.; O'NEILL, G.P.; CHENG, R.; LIU, Y.; HOWARD, A.D.; COULOMBE, N.; TAN, C.P.; TANG-NGUYEN, A.T.; GEORGE, S.R.; O'DOWD, B.F. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. **FEBS Letts**, v. 446, p.103–107, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00009-5)

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p.76-86, 1979.

<https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>

LINDNER, G. M.; WRIGHT, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, n. 4, p. 407 - 416, 1983. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90201-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90201-7)

LIU, H.; XU, G.; YUAN, Z.; DONG, Y.; WANG, J.; LU, W. Effect of kisspeptin on the proliferation and apoptosis of bovine granulosa cells. **Animal reproduction science**, v. 185, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.07.008>

LIU, X.; LEE, K.; HERBISON, Al. E. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. **Endocrinology**, v. 149, n. 9, p. 4605-4614, 2008. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0321>

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17–22, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, 65:137-152. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.028>

LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, n. 2, p. 115-128, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1022945107762>

MACEDO, G. G.; MAIO, J. R. G.; MONTEIRO, B. M.; BATISTA, E. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SOARES, J. G.; SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, G. M.; MENDANHA, M. F.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Kisspeptin stimulates LH release, is enhanced by estradiol and induces

ovulation in bovine females. In: 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2013, Praia do Forte. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 29th to September 1st. Uberlândia: CBRA, 2013. v. 1, p. 411-411.

MAGEE, C.; FORADORI, C. D.; BRUEMMER, J. E.; ARREGUIN-AREVALO, J. A.; MCCUE, P. M.; HANDA, R. J.; SQUIRES, E.L.; CLAY C.M. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology*, v. 150, n. 6, p. 2813-2821, 2009. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1698>

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 3, 1995.

MARK, P.J.; JONES, M.L.; LEWIS, J.L.; WADDELL, B.J.; SMITH, J.T. Kiss1 and Kiss1r mRNA expression in the rat placenta: changes with gestational age and regulation by glucocorticoids. **Placenta**, v. 34, n. 8, p. 657-662, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.04.012>

MARTINO, N. A.; RIZZO, A.; PIZZI, F.; DELL'AQUILA, M. E.; SCIORSCI, R. L. Effects of kisspeptin-10 on *in vitro* proliferation and kisspeptin receptor expression in primary epithelial cell cultures isolated from bovine placental cotyledons of fetuses at the first trimester of pregnancy. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 978-987. e1, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.033>

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, 8: 57-68. 2000.

MERHI, Z.; THORNTON, K.; BONNEY, E.; CIPOLLA, M. J.; CHARRON, M. J.; BUYUK, E. Ovarian kisspeptin expression is related to age and to monocyte chemoattractant protein-1. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 33, n. 4, p. 535-543, 2016. <https://10.1007/s10815-016-0672-x>

MIRANDA, L. E. C.; VIARO, F.; CENEVIVA, R.; ÉVORA, P. R. B. A atividade respiratória mitocondrial é um bom parâmetro para a lesão por esquia e reperfusão hepática?. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.42, n.2, p.89-94, 2005.

MONTEIRO, C.M.R.; FARIAS, E.C.; PERRI, S.H.V.; SOUZA, W.M.. Estudos das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 45-54, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962003000100005>

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 609 p.

MUIR, A.I.; CHAMBERLAIN, L.; ELSHOURBAGY, N.A.; MICHALOVICH, D.; MOORE, D.J.; CALAMARI, A.; SZEKEREST, P.G.;... & HARRISON, D.C. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 28969-28975, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102743200>

NATAL, F. L. N.; DE MELO, A. J. F.; JIMENEZ FILHO, D. L.; DUARTE, K. M. R.; ALVAREZ, R. H. Indução da ovulação e características ovarianas de marrãs pre-púberes tratadas com

gonadotrofina coriônica humana ou kisspeptina. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, n. 1, p. 9-14, 2016.

NAVARRO, V. M.; FERNANDEZ FERNANDEZ, R.; CASTELLANO, J. M.; ROA, J., MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; ... & TENA-SEMPERE, M. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. **The Journal of physiology**, v. 561, n. 2, p. 379-386, 2004. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072298>

OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAO, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613, 2001. <https://doi.org/10.1038/35079135>

OLBRICH, T.; ZIEGLER, E.; TÜRK, G.; SCHUBERT, A.; EMONS, G.; GRÜNDKER, C. Kisspeptin-10 inhibits bone-directed migration of GPR54-positive breast cancer cells: Evidence for a dose–window effect. **Gynecologic oncology**, v. 119, n. 3, p. 571-578, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.08.018>

OLIVEIRA, M. **Kisspeptina: efeito na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos**. 2016. 52p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias; Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

OWENS, L.; ABBARA, A.; LERNER, A.; SHANNON, O.; CHRISTOPOULOS, G.; KHANJANI, S.; ISLAM, R.; LIYANAGE, M.; HARDY, K.; LAVERY, S.; HANYALOGU, A.; DHILLO, W.; FRANKS, S. The *in vivo* and *in vitro* effects of kisspeptin on human ovarian function. In: **20th European Congress of Endocrinology**. BioScientifica, 2018. <https://doi.org/10.1530/endoabs.56.OC2.1>

PARK, D. W.; LEE, S. K.; HONG, S. R.; HAN, A. R.; KWAK-KIM, J.; YANG, K. M. Expression of Kisspeptin and its receptor GPR54 in the first trimester trophoblast of women with recurrent pregnancy loss. **American journal of reproductive immunology**, v. 67, n. 2, p. 132-139, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01073.x>

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKOPARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)

PERRY, G. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v.32, p. 14-26, 2014.

PETERS, H. Migration of gonocytes in to mammalian gonad and their differentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, v. 259, n. 828, p. 91-101, 1970. <https://doi.org/10.1098/rstb.1970.0048>

PETROV, E. P.; SCHWILLE, P. State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy. In: **Standardization and quality assurance in fluorescence measurements II**. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 145-197.

PINEDA, R.; GARCIA-GALIANO, D.; ROSEWEIR, A.; ROMERO, M.; SANCHEZ-GARRIDO, M. A.; RUIZ-PINO, F.; MORGAN, K.; PINILLA, L.; MILLAR, R. P.; TENA-SEMPERE, M. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p.722-730, 2010. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0803>

RICHARD, N.; CORVAISIER, S.; CAMACHO, E.; KOTTLER, M. L. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 123-129, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.09.015>

RICU, M. A.; RAMIREZ, V. D.; PAREDES, A. H.; LARA, H. E. Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. **Endocrinology**, v. 153, n. 10, p. 4966-4977, 2012. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1279>

ROA, J.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 48-69, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.07.002>

ROSEWEIR, A. K.; KAUFFMAN, A. S.; SMITH, J. T.; GUERRIERO, K. A.; MORGAN, K.; PIELECKA-FORTUNA, J.; PINEDA, R.; GOTTSCH, M.L.; TENA-SEMPERE, M.; MOENTER, S.M.; TERASAWA, E.; CLARKE, I.J.; STEINER, R.A.; MILLAR, R.P. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3920-3929, 2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009>

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.229-233, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007001000021>

SAADELDIN, I. M.; KOO, O. J.; KANG, J. T.; KWON, D. K.; PARK, S. J.; KIM, S.; PARK, S. J.; KIM, S. J.; MOON, J. H.; HYUN, J. O.; JANG, G.; LEE, B. C. Paradoxical effects of kisspeptin: It enhances oocyte *in vitro* maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during *in vitro* culture. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 5, p. 656-668, 2012. <https://doi.org/10.1071/RD11118>

SAHIN, Z.; CANPOLAT, S.; OZCAN, M.; OZGOCER, T.; KELESTIMUR, H. Kisspeptin antagonist prevents RF9-induced reproductive changes in female rats. **Reproduction**, v. 149, n. 5, p. 465-473, 2015. <https://doi:10.1530/REP-14-0683>

SÀNCHEZ, F.; SIMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1896-1912, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>

SARTORELLI, E. S.; SATRAPA, R. A.; BARCELOS, A. C. Z.; POTIENS, J. R.; BARROS, C. M. Influência do estresse térmico na taxa de apoptose de embriões bovinos (*indicus* vs. *taurus*) produzidos *in vitro* e na capacidade dos mesmos originarem gestações. **Acta Sci. Vet**, v. 34, p. 476, 2006.

- SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. *Recueil de Médecine. Vétérinaire*, v. 167, p. 205-218, 1991.
- SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO JR, J. S.; SHAGOURY, J. K.; ... & ZAHN, D. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*, v. 349, n. 17, p. 1614-1627, 2003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>
- SEYMOUR, A. J.; SCOTT, V.; AUGUSTINE, R. A.; BOUWER, G. T.; CAMPBELL, R. E.; BROWN, C. H. Development of an excitatory kisspeptin projection to the oxytocin system in late pregnancy. *The Journal of physiology*, v. 595, n. 3, p. 825-838, 2017. <https://doi.org/10.1113/JP273051>
- SHAHAB, M.; MASTRONARDI, C.; SEMINARA, S. B.; CROWLEY, W. F.; OJEDA, S. R.; PLANT, T. M. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 6, p. 2129-2134, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409822102>
- SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 3, 2011. ISSN 0102-0803.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, p. 1241-1254, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00480-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00480-0)
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>
- SMITH, J. T. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides*, v. 30, n. 1, p. 94-102, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.08.013>
- SMITH, J. T.; CLAY, C. M.; CARATY, A.; CLARKE, I. J. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, v. 148, n. 3, p. 1150-1157, 2007. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1435>
- SMITH, J. T.; CUNNINGHAM, M. J.; RISSMAN, E. F.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, v. 146, n. 9, p. 3686-3692, 2005b. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0488>
- SMITH, J. T.; DUNGAN, H. M.; STOLL, E. A.; GOTTSCH, M. L.; BRAUN, R. E.; EACKER, S. M.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R. A. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, v. 146, n. 7, p. 2976-2984, 2005a. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0323>
- SMITH, J. T.; ROSEWEIR, A.; MILLAR, M.; CLARKE, I.; MILLAR, R. P. Stimulation of growth hormone by kisspeptin antagonists in ewes. *Journal of Endocrinology*, p. JOE-18-0074, 2018. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0074>

SOARES, M. M. **Influência da Kisspeptina na etapa de seleção espermática para a produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2018. 74p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias; Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

SOARES, M. M.; DE CÁSSIA ANTONINO, D.; OLIVEIRA, M.; JÚNIOR, J. M.; PEIXOTO, L. R.; MAIA, T. S.; ALVES, K. A.; JACOMINI, J. O.; SANTOS, R. M.; MACEDO, G. G. The role of Kisspeptin in bovine *in vitro* embryo production. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 621-630, 2018. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p621>

SONG, G. Q.; ZHAO, Y. Kisspeptin 10 inhibits the Warburg effect in breast cancer through the Smad signaling pathway: both *in vitro* and in vivo. **American journal of translational research**, v. 8, n. 1, p. 188, 2016.

SOUNDARARAJAN, R.; RAO, A.J. Trophoblast'pseudo-tumorigenesis': significance and contributory factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 15, 2004. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-15>

STAFFORD, L. J.; XIA, C.; MA, W.; CAI, Y.; LIU, M. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. **Cancer research**, v. 62, n. 19, p. 5399-5404, 2002.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v. 2, n. 8085, p. 366, 1978.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112-113, Illinois, 1998.

SUZUKI, S.; KADOKAWA, H.; HASHIZUME, T. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. **Animal reproduction science**, v. 103, n. 3-4, p. 360-365, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.05.016>

SUZUKI, T.; FUJIKURA, K.; HIGASHIYAMA, T.; TAKATA, K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, n. 1, p. 49-53, 1997. <https://doi.org/10.1177/002215549704500107>

TANYAPANYACHON, P.; AMELKINA, O.; CHATDARONG, K. The expression of kisspeptin and its receptor in the domestic cat ovary and uterus in different stages of the ovarian cycle. **Theriogenology**, v. 117, p. 40-48, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.019>

TENA-SEMPERE, M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 314, n. 2, p. 164-169, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.05.004>

TSUTSUI, K.; BENTLEY, G. E.; KRIEGSFELD, L. J.; OSUGI, T.; SEONG, J. Y.; VAUDRY, H. Discovery and Evolutionary History of Gonadotrophin Inhibitory Hormone and Kisspeptin: New Key Neuropeptides Controlling Reproduction. **Journal of neuroendocrinology**, v. 22, n. 7, p. 716-727, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02018.x>

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717- 1751, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>

VIANA, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. **Embrapa Gado de Leite- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009. ISSN 1678-3131

WEST A; VOJTA, P.J.; WELCH, D.R.; WEISSMAN, B.E. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). **Genomics**. 1998 Nov 15;54(1):145-8 <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5566>

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS JR, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 893-901, 2001. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.893>

XIAO, Y.; NI, Y.; HUANG, Y.; WU, J.; GROSSMANN, R.; ZHAO, R. Effects of kisspeptin-10 on progesterone secretion in cultured chicken ovarian granulosa cells from preovulatory (F1-F3) follicles. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 2091-2097, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.09.001>

XU, Z.; ALLEN GARVERICK, H.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 4, p. 951-957, 1995. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.4.951>

ZHAI, J.; LIU, J.; ZHAO, S.; ZHAO, H.; CHEN, Z.; DU, Y.; LI, W. P. Kisspeptin-10 inhibits OHSS by suppressing VEGF secretion. **Reproduction**, p. REP-17-0268, 2017. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0268>