

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**BLOQUEIO MEIÓTICO EM OÓCITOS DE EQUINOS COMO ALTERNATIVA
PARA MELHORA DA VIABILIDADE**

MARIANA LEMOS NAGIB JORGE

Botucatu, SP
Janeiro - 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**BLOQUEIO MEIÓTICO EM OÓCITOS DE EQUINOS COMO ALTERNATIVA
PARA MELHORA DA VIABILIDADE**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de MESTRE

Mariana Lemos Nagib Jorge

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda da Cruz
Landim

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Elisa Sant’Anna
Monteiro da Silva

Botucatu, SP
Janeiro - 2023

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Jorge, Mariana Lemos Nagib.

Bloqueio meiótico em oócitos de equinos como alternativa para melhora da viabilidade / Mariana Lemos Nagib Jorge. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Coorientador: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Capes: 50504002

1. Equino. 2. Reprodução assistida. 3. Tecnologias reprodutivas. 4. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 5. Fecundidade. 6. Injeções de esperma intracitoplásmicas.

Palavras-chave: Fertilidade; ICSI; Maturação oocitária; Reprodução assistida.

Nome da autora: Mariana Lemos Nagib Jorge

Título: BLOQUEIO MEIÓTICO EM OÓCITOS DE EQUINOS COMO ALTERNATIVA PARA MELHORA DA VIABILIDADE

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP Botucatu – SP

Prof.^a Dr.^a Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP Botucatu – SP

Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

UFMG, Belo Horizonte – MG

Data da Defesa: 27 de janeiro de 2023.

*Dedico aos meus pais, Renata e Renato, e ao meu
marido, João Vitor, por todo incentivo
e apoio na minha caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Nossa Senhora por me permitirem chegar até aqui e por terem me apresentado com uma família que sempre acreditou em mim e me apoiou.

Agradeço aos meus pais, Renato e Renata, meu marido João Vitor e minha irmã Gabriela por todo amor e carinho que me dão.

Agradeço à Prof.^a Fernanda por ter aceitado me orientar e por acreditar que eu seria capaz de desenvolver este trabalho. Agradeço a FMVZ - Unesp Botucatu, docentes, funcionários e colegas de jornada por toda formação proporcionada a mim durante a Residência e o Mestrado.

Agradeço à Prof.^a Elisa por ter aceitado me coorientar e por abrir as portas da UFU para mim. Agradeço às docentes do Departamento de Reprodução Animal, da UFU, por me receberem lá.

Agradeço ao Frigofava e à M.V. Andressa por me cederem os ovários utilizados nesta pesquisa.

Agradeço às técnicas da UFU Graciele e Mariani pelo suporte durante a manipulação dos oócitos e análise no microscópio confocal.

Agradeço à pós-graduanda Thaisy pela ajuda, mesmo que a distância, para a realização deste trabalho e pela análise da expressão gênica.

Agradeço à Dra. Carmen por ceder os instrumentos para curetagem dos ovários e pela amizade de longos anos.

Agradeço à Juliana pela análise estatística e por sanar minhas dúvidas sobre o assunto.

Agradeço à Omics Biotecnologia Animal por ceder os materiais utilizados nesta pesquisa.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa no início do Mestrado.

Agradeço à Fapesp (processo 2020/01646-5) pela concessão da bolsa e dos recursos para viabilizar a execução do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas,
se eu quiser conhecer as borboletas...”*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

JORGE, M.L.N. **BLOQUEIO MEIÓTICO EM OÓCITOS DE EQUINOS COMO ALTERNATIVA PARA MELHORA DA VIABILIDADE**. Botucatu – SP. 2023. 69 p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A manutenção dos oócitos equinos em bloqueio meiótico, seja através do uso de inibidores de meiose ou manutenção deles em temperatura ambiente, é benéfica para o posterior desenvolvimento embrionário. Com o objetivo de testar a viabilidade da manutenção de oócitos em meio de cultivo embrionário comercial disponível no Brasil (Botuembryo), comparando ao meio de cultivo acrescido de inibidor de meiose (Butirolactona), antes da maturação *in vitro* (MIV), concebeu-se este ensaio. Foram utilizados 149 oócitos equinos, separados em 3 grupos: Controle, Botuembryo e Butirolactona. O grupo Controle seguiu direto para a MIV por 24 horas, os grupos Botuembryo e Butirolactona passaram por um processo de pré-maturação (PM) por 20 horas com os respectivos produtos, e depois seguiram para a MIV por mais 24 horas. No grupo Controle, o momento 1 (M1) corresponde ao momento da obtenção dos oócitos, já nos grupos Botuembryo e Butirolactona, o M1 corresponde ao final da PM. O momento 2 (M2), nos 3 grupos, foi após a MIV. Após a coloração, a maturação nuclear e citoplasmática foi avaliada pela microscopia confocal. A investigação da expressão gênica foi realizada por RT-qPCR. Nos oócitos foram analisados os genes: Proteína Morfogênica Óssea 15 (BMP15), Conexina 37 (Cx37), Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF9) e Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP2); já nas células do cumulus (CCs) foram avaliados os genes: Ampiregulina (AREG), Conexina 43 (Cx43), Hialurona Sintetase 2 (HAS2), Receptor de FSH (FSHR) e Receptor de LH (LHR). Na avaliação da maturação nuclear foram encontrados resultados semelhantes entre os grupos tratados e na análise da maturação citoplasmática foi encontrado no grupo Butirolactona o maior percentual de oócitos imaturos no M1, maior percentual de oócitos maduros no M2, e menor percentual de degeneração. Por outro lado, os dados da expressão gênica, demonstraram que houve falha do bloqueio da maturação molecular no grupo Butirolactona, com aumento da abundância de AREG e HAS2 no M1, e diminuição no M2. Além

disso, observou-se superioridade do grupo Botuembryo, entre os grupos tratados, no M1, em relação a menor abundância de AREG, LHR e HAS2 e maior abundância de FSHR; já no M2, apresentou maior abundância de GDF9, indicando melhor qualidade tanto dos oócitos como das CCs. Embora os resultados obtidos com o uso da Butirolactona ou do Botuembryo sejam semelhantes em relação a maturação nuclear e citoplasmática, os resultados de maturação molecular demonstraram a superioridade do Botuembryo para manter a qualidade de oócitos e CCs antes da realização de técnicas de fertilização assistida em equinos.

Palavras-chave: reprodução assistida, fertilidade, ICSI, maturação oocitária

ABSTRACT

JORGE, M.L.N. MEIOTIC BLOCK IN EQUINE OOCYTES AS AN ALTERNATIVE FOR VIABILITY IMPROVEMENT. Botucatu – SP. 2023. 69 p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The maintenance of equine oocytes in meiotic block, either using meiosis inhibitors or keeping them at room temperature, is beneficial for the later embryonic development. With the objective of testing the viability of maintaining oocytes in commercial embryonic culture medium available in Brazil (Botuembryo), comparing to the culture medium added with a meiosis inhibitor (Butyrolactone), before in vitro maturation (IVM), this assay was conceived. One hundred and forty-nine equine oocytes were used, separated into 3 groups: Control, Botuembryo and Butyrolactone. The Control group went straight to IVM for 24 hours, the Botuembryo and Butyrolactone groups went through a pre-maturation (PM) process for 20 hours with the respective products, and then went to IVM for another 24 hours. In the Control group, moment 1 (M1) corresponds to the moment of obtaining the oocytes, while in the Botuembryo and Butyrolactone groups, M1 corresponds to the end of PM. Moment 2 (M2), in the 3 groups, was after IVM. After staining, nuclear and cytoplasmic maturation was assessed by confocal microscopy. The investigation of gene expression was performed by RT-qPCR. The following genes were analyzed in the oocytes: Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), Connexin 37 (Cx37), Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) and Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2); in the cumulus cells (CCs), the following genes were evaluated: Ampiregulin (AREG), Connexin 43 (Cx43), Hyalurone Synthetase 2 (HAS2), FSH Receptor (FSHR) and LH Receptor (LHR). In the evaluation of nuclear maturation, similar results were found between the treated groups and in the assessment of cytoplasmic maturation, the highest percentage of immature oocytes in M1, the highest percentage of mature oocytes in M2, and the lowest percentage of degeneration were found in the Butyrolactone group. On the other hand, gene expression data showed that there was a failure to block molecular maturation in the Butyrolactone group, with an increase in the abundance of AREG and HAS2 in M1, and a decrease in M2. In

addition, superiority was observed for the Botuembryo group, between treated groups, in M1, in relation to the lower abundance of AREG, LHR and HAS2 and the higher abundance of FSHR, in M2, it presented a greater abundance of GDF9, indicating better quality of both oocytes and CCs. Although the results obtained with the use of Butyrolactone or Botuembryo are similar in relation to nuclear and cytoplasmic maturation, the molecular maturation results demonstrated the superiority of Botuembryo to maintain the quality of oocytes and cumulus cells before carrying out assisted fertilization techniques in horses.

Keywords: assisted reproduction, fertility, ICSI, oocyte maturation

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

FIGURA 1. Na figura 1a observamos ovários equinos obtidos no mês de novembro de 2021, após a dissecação para evidenciar os folículos. Na figura 1b observamos ovários equinos obtidos no mês de maio de 2022, antes da dissecação, evidenciando a porção medular. Na figura 1c observamos a porção cortical dos ovários obtidos neste mesmo período.....	5
FIGURA 2. Materiais utilizados na recuperação de oócitos equinos pela técnica de “curetagem”	6
FIGURA 3. Nas figuras 3a e b observamos os COCs equinos antes da MIV. Na figura 3c vemos COCs equinos compactos e na figura 3d COCs equinos expandidos. Na figura 3e vemos oócitos equinos desnudados após sucessivas pipetagens em solução de Tripsina – EDTA. Todos os oócitos foram observados na lupa.....	7
FIGURA 4. COCs equinos após a maturação por 24 horas em placa 4 poços, observados na lupa.....	9
FIGURA 5. Análise da expressão gênica de oócitos equinos.	17

Capítulo 2

FIGURA 1. Na figura 1a temos VG, na figura 1b QVG, ambas com o citoplasma imaturo. Na figura 1c e d observamos o núcleo em MI. Na figura 1e vemos o núcleo em MII, com extrusão do 1º CP. Nas figuras 1c, 1d e 1e o citoplasma está maduro. Na figura 1f temos um ócito degenerado, com núcleo picnótico. Na figura 1g temos um oócito não analisável, onde não observamos o material genético. As mitocôndrias foram coradas por MitoTracker Orange CMTMRos (coloração vermelha e indicadas pelo *) e o material genético por YO-PRO-1 Iodide (coloração verde, indicada pela seta)	42
---	----

FIGURA 2. Resultados de expressão gênica de diferentes genes expressos nas CCs de oócitos equinos, em grupos e momentos distintos.....	48
FIGURA 3. Resultados de expressão gênica de diferentes genes expressos nos oócitos equinos, em grupos e momentos distintos.....	49

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

TABELA 1. Primers para CCs equinas.....	44
TABELA 2. Primers para oócitos equinos.	44
TABELA 3. Foi realizado o Teste de Qui-quadrado (χ^2) para comparação das proporções de maturação ($P < 0,05$), nos diferentes grupos e momentos. O número entre parênteses corresponde ao valor total de oócitos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB = β -actin

AMPC = monofosfato de adenosina cíclica

AREG = Ampirregulina

ATP = adenosina trifosfato

BMP15 = Proteína Morfogenética Óssea 15

Botu = Botuembryo

Butiro = Butirolactona

CC = célula do cumulus

CDK = quinase dependente de ciclina

cDNA = DNA complementar

CEUA = comitê de ética no uso de animais

Cit Im = citoplasma imaturo

Cit Mad = citoplasma maduro

CL = corpo lúteo

CO₂ = gás carbônico

COC = complexo cumulus-oócito

CONCEA = Conselho nacional de experimento animal

CP = corpúsculo polar

Ct = ciclo de threshold

Cx37 = Conexina 37

Cx43 = Conexina 43

D = degenerado

DMEM/F12 = *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNase = desoxirribonuclease

DP = desvio padrão da média

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM = erro padrão da média

ESD = *extreme studentized deviate*

FIV = fertilização *in vitro*

FSH = hormônio folículo estimulante

FSHR = receptor de FSH

GDF9 = Fator de Crescimento e Diferenciação 9
HAS2 = Hialurona Sintetase 2
h = hora
ICSI = injeção intracitoplasmática de espermatozoide
LH = hormônio luteinizante
LHR = receptor de LH
M = média
M1 = momento 1
M2 = momento 2
MAPK = proteína quinase ativada por mitógenos
MB = meio com DMEM/F12, SFB e Penicilina-Estreptomicina
Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ = método Ct comparativo
MI = metáfase I
MII = metáfase II
MIV = maturação *in vitro*
MMP1 = Metaloproteinase de Matriz 1
MMP2 = Metaloproteinase de Matriz 2
MPF = fator promotor de maturação
NA = não analisável
PBS = tampão fosfato-salino
PCR = reação em cadeia da polimerase
PDE3A = Fosfodiesterase 3A
PIV = produção *in vitro*
PKA = proteína quinase A
PM = pré-maturação
QVG = quebra da vesícula germinativa
RNA = ácido ribonucleico
RNAm = ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SF = solução fisiológica 0,9%
SFB = soro fetal bovino
TO = transferência de oócitos
VG = vesícula germinativa
 χ^2 = teste do Qui-quadrado

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos da reprodução equina.....	3
2.2 Maturação oocitária.....	7
2.2.1 Maturação nuclear.....	11
2.2.2 Maturação citoplasmática.....	12
2.2.3 Maturação molecular.....	14
2.3 Bloqueio meiótico em oócitos.....	17
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo Geral.....	21
4.2 Objetivos Específicos.....	21
5. REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2.....	31
ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
Resumo.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Aspectos éticos.....	37
2.2 Obtenção do material biológico.....	38
2.3 Delineamento experimental.....	39
2.4 Confecção das lâminas e avaliações.....	39
2.4.1 Maturação citoplasmática.....	40
2.4.2 Maturação nuclear.....	41
2.5 Expressão gênica.....	43
2.6 Análise estatística.....	45
3. RESULTADOS.....	45
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÃO.....	62
AGRADECIMENTOS.....	62

REFERÊNCIAS.....	62
-------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos 25 anos, muitas tecnologias inovadoras de reprodução assistida foram desenvolvidas e incorporadas na indústria equina (SQUIRES, 2019). As técnicas de reprodução assistida são vantajosas pois permitem a produção de embriões de éguas que estão em competição, além de prolongar a vida reprodutiva de animais geneticamente superiores (DUCHEYNE et al., 2019).

Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas na área de reprodução equina, porém a produção *in vitro* (PIV) de embriões nessa espécie ainda requer muitos estudos. Uma das etapas da PIV é a maturação *in vitro* (MIV), cujo objetivo é fazer com que oócitos imaturos atinjam a metáfase II (MII). A fertilização *in vitro* (FIV) em equinos ainda não está tão difundida como nos bovinos, sendo a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) a alternativa mais utilizada e eficiente para os equinos. No exterior esta técnica já é bastante difundida, e no Brasil vem sendo utilizada e está em expansão. Entretanto seu custo ainda é um fator limitador. Outra técnica que pode ser utilizada é a transferência de oócitos (TO) (CARNEIRO, 2016; MORRIS, 2018), onde o oócito de uma égua doadora, com genética superior é transferido para o oviduto de uma receptora.

Os oócitos podem ser obtidos pela aspiração folicular de uma égua devidamente sedada ou *post mortem* (CARNEVALE, 2016). Éguas de grande valor genético ou mérito esportivo podem vir a óbito por acidentes, patologias ou naturalmente, e a coleta de seus ovários e posterior aspiração folicular, com o auxílio de técnicas de reprodução assistida, permite a geração de descendentes. Além disso, os ovários podem também ser obtidos em abatedouros de equinos, para fins de pesquisa.

A simples retirada do oócito do ambiente folicular já induz a retomada da meiose (CONTI et al., 2002), e com isso ele pode não apresentar sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática. A pré-maturação (PM) é benéfica por promover uma sincronização entre a maturação nuclear e citoplasmática, conferindo maior competência de desenvolvimento aos oócitos.

Devido ao baixo número de abatedouros equinos e a sua distribuição heterogênea, as pesquisas nesta área, em nosso País, evoluem lentamente.

Além disso, os equipamentos e a mão de obra qualificada para trabalhar com a ICSI ou TO é limitada, sendo necessário o transporte dos oócitos até outros centros reprodutivos. Como forma de minimizar os efeitos deste transporte, antes de iniciar a MIV, os oócitos imaturos podem passar por um período de PM.

Esse tempo de PM pode ser utilizado para o transporte dos oócitos, para que o proprietário da égua tenha mais tempo para se decidir pelo ganhão que utilizará e fazer com que o sêmen chegue até o local para ser utilizado, ou para o envio dos oócitos para outros laboratórios que dominem as técnicas de MIV e ICSI (HINRICHS, 2020). Nosso País tem dimensões continentais, e muitas vezes o sêmen equino está distante do local que será feito a ICSI. A PM permite este “ganho de tempo” para o transporte.

O transporte dos oócitos pode ser realizado em um período maior do que o transporte dos ovários. Os ovários, provenientes de fêmeas que vieram a óbito, devem ser processados em até 6 horas após a morte (MCKINNON et al., 2011). Já o transporte dos oócitos, colocando-os em PM, permite que eles sejam mantidos por até 20 horas (DINI et al., 2016).

A PM geralmente é realizada utilizando-se inibidores da meiose (LODDE et al., 2019). Entretanto, apesar dos meios para manutenção e transporte de embriões não serem recomendados para o transporte de oócitos, foram desenvolvidas pesquisas mostrando que os oócitos imaturos também podem ser mantidos em bloqueio meiótico sem a utilização de inibidores de meiose, bastando mantê-los em temperatura ambiente e em meios pobres como os de transporte de embriões (CHOI et al., 2006b; MARTINO et al., 2014). Apesar disso, no Brasil, não há dados sobre a viabilidade da manutenção de oócitos em meio de cultivo embrionário comercial disponível no mercado nacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos da reprodução equina

As éguas são classificadas como fêmeas poliétricas sazonais, a estação reprodutiva ocorre no final da primavera e no verão (AURICH, 2011). O ciclo estral normalmente é de 21 dias, podendo apresentar variações. A duração do estro varia de 3 a 7 dias, com pelo menos um folículo pré-ovulatório e aumento

dos níveis séricos de estrógeno. A ovulação ocorre entre 24 e 48h antes do final do estro (HUGHES; STABENFELDT; CAPLAN, 1971). Na ovulação, o diâmetro folicular é variável (30 a 70 mm), normalmente as ovulações ocorrem entre 40 e 45 mm (LEY, 2006). A duração do diestro varia de 13 a 17 dias, com a presença do corpo lúteo (CL) e aumento dos níveis séricos de progesterona (BRINSKO et al., 2011).

A foliculogênese na égua pode ser dividida em: recrutamento, seleção e dominância. O aumento do hormônio folículo estimulante (FSH) promove o recrutamento folicular, o pico de FSH ocorre quando o maior folículo atinge 13 mm e passa a liberar inibina (GASTAL et al., 1997). O desvio folicular pode ser considerado quando o maior folículo atinge 22,5 mm e torna-se dominante (GINTHER et al., 2008). A dinâmica folicular na égua sofre influência de diversos fatores como: nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo (GURGEL et al., 2008).

A égua não apresenta um pico de liberação de hormônio luteinizante (LH), mas sim um aumento contínuo e progressivo no estro, atingindo o pico 1 dia após a ovulação (LEY, 2006; GINTHER et al., 2008). O aumento de LH é responsável pela: diferenciação das células foliculares, da granulosa e tecais para que ocorra a ovulação e luteinização, com a formação do CL; expansão das CCs; maturação oocitária (GÉRARD; ROBIN, 2019).

Além disso, diferentemente de outras espécies, a porção cortical do ovário, com a presença dos folículos e CL é mais centralizada, enquanto a porção medular, onde estão os vasos sanguíneos, é externa. No ovário equino encontramos outra peculiaridade que é a fossa ovulatória, o epitélio germinativo está localizado exclusivamente aqui, e a ovulação ocorre sempre por ela (BRÜCK; GREVE; HYTTEL, 1999).

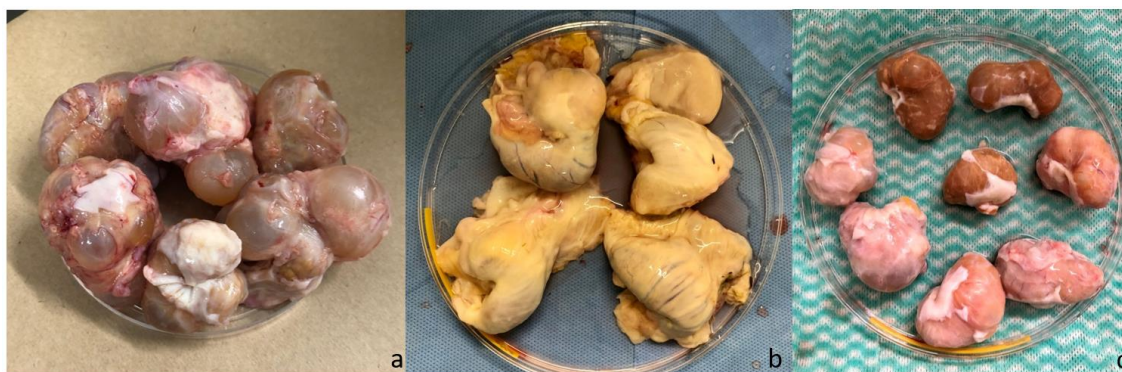


FIGURA 1. Na figura 1a observamos ovários equinos obtidos no mês de novembro de 2021, após a dissecação para evidenciar os folículos. Na figura 1b observamos ovários equinos obtidos no mês de maio de 2022, antes da dissecação, evidenciando a porção medular. Na figura 1c observamos a porção cortical dos ovários obtidos neste mesmo período. Fonte: Acervo pessoal.

O folículo ovariano é responsável pela secreção de hormônios e é dentro dele que ocorre o desenvolvimento do oócito. Segundo Prestes e Landim-Alvarenga (2017), os folículos ovarianos podem ser classificados em:

- Folículo primordial: presença de um oócito primário, envolvido por uma única camada de células foliculares achatadas. Correspondem ao “reservatório de gametas” da fêmea.
- Folículo primário: oócito primário em crescimento, com uma camada de células foliculares cuboides.
- Folículo secundário: oócito primário circundado pela zona pelúcida, com a presença de pelo menos 2 camadas de células da granulosa de formato cuboide.
- Folículo terciário: presença do antro folicular, uma cavidade contendo líquido, zona pelúcida, corona radiata, CCs, foliculares e tecais e membrana basal.
- Folículo De Graaf ou pré-ovulatório: presença de um oócito secundário, com todas as estruturas já descritas no folículo terciário. É o último estágio de desenvolvimento do folículo.

Quando ocorre a ovulação dos equinos, é o oócito secundário que é ovulado. Ele mede aproximadamente 125 μm , sem a zona pelúcida e a corona

radiata. O oócito, juntamente com as CCs, formam o complexo cumulus-oócito (COC). O COC equino mensura aproximadamente 250 μm (LEY, 2006).

Segundo Brück, Greve e Hyttel (1999), nos equinos, o oócito apresenta-se aderido firmemente a parede folicular. Por isso, nesta espécie, uma maior recuperação oocitária é obtida através do uso de cureta (ALM et al., 1997). O folículo é incisado com uma lâmina de bisturi, o conteúdo folicular é recuperado e em seguida se procede a “curetagem” folicular (HINRICHS, 2010), porém o tempo para a recuperação dos oócitos é maior.

Outras técnicas que podem ser utilizadas para recuperação de oócitos são: aspiração folicular e “slicing” do ovário (CHOI et al., 1993). A coleta por aspiração, como é realizada em bovinos, resulta em baixos índices de recuperação, com um grande percentual de oócitos desnudos (BRÜCK; GREVE; HYTTTEL, 1999; LANDIM-ALVARENGA, 1999). Após a obtenção dos oócitos, estes devem ser maturados *in vitro*.



FIGURA 2. Materiais utilizados na recuperação de oócitos equinos pela técnica de “curetagem”. Fonte: Acervo pessoal.

O primeiro relato de MIV em equinos foi feito na Polônia (FULKA; OKOLSKI, 1981), com oócitos obtidos de abatedouros. No Brasil o abate de equinos não é comum, tendo poucas unidades abatedoras dessa espécie, o que prejudica a disponibilidade de oócitos e os avanços na área.

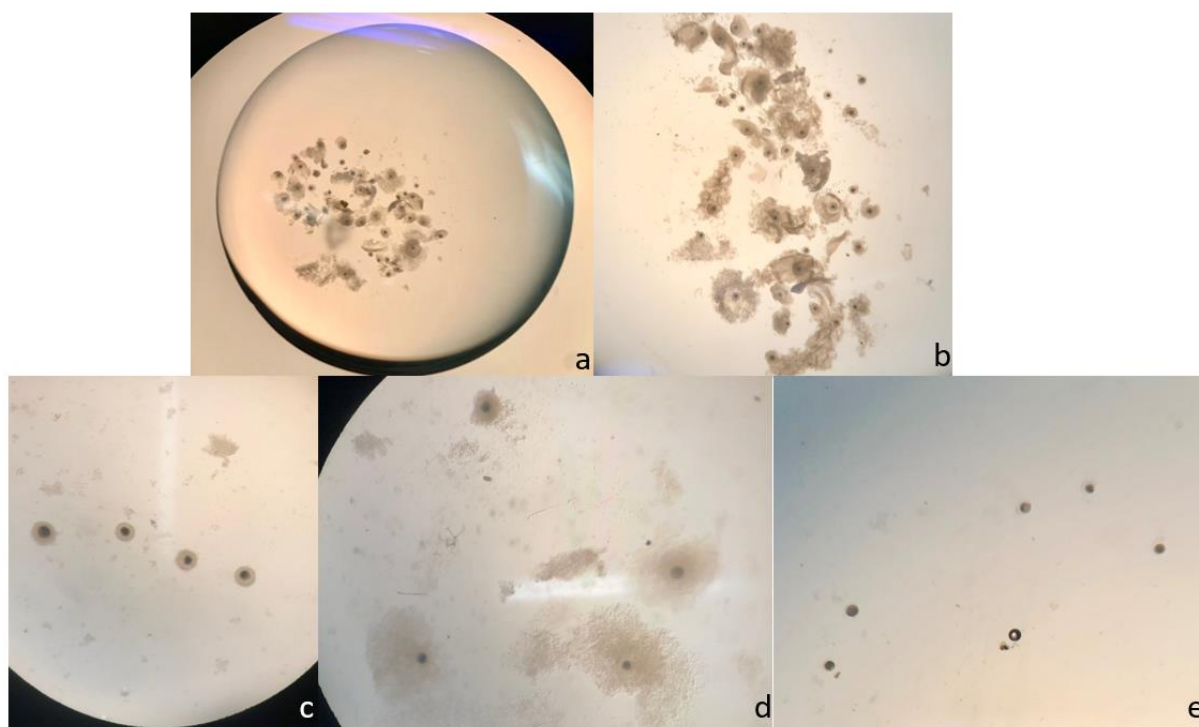


FIGURA 3. Nas figuras 3a e b observamos os COCs equinos antes da MIV. Na figura 3c vemos COCs equinos compactos e na figura 3d COCs equinos expandidos. Na figura 3e vemos oócitos equinos desnudados após sucessivas pipetagens em solução de Tripsina – EDTA. Todos os oócitos foram observados na lupa. Fonte: Acervo pessoal.

2.2 Maturação oocitária

As fêmeas apresentam, ao nascimento, folículos primordiais com oócitos bloqueados na Prófase I, da primeira divisão da meiose. Nesta fase, os núcleos dos oócitos são classificados em Vesícula Germinativa (VG). As fêmeas já nascem com todos os seus oócitos tendo sido formados durante a vida fetal (PICTON, 2001). Na puberdade, o estímulo do LH é responsável pela retomada da meiose. Quando as fêmeas atingem a maturidade sexual, a cada ciclo estral, alguns destes oócitos se desenvolvem e pouquíssimos deles ovulam (CURCIO et al., 2006b).

Quando os oócitos são removidos dos folículos ocorre espontaneamente a quebra da vesícula germinativa (CONTI et al., 2002). A prevenção da retomada da meiose de maneira prematura é fundamental para o desenvolvimento oocitário. A retomada da meiose é regulada por mudanças na fosforilação de diferentes proteínas por quinases específicas. Antes que ocorra a ovulação é necessária a capacitação do oócito, devendo ocorrer a sincronização entre a

maturação nuclear e citoplasmática, o que ocorre normalmente na maturação *in vivo*. Já na MIV, a retomada da meiose ocorre independente da competência oocitária, e a maturação citoplasmática e nuclear podem não apresentar sincronia (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014). Segundo Downs (1993), a retomada da meiose pode ocorrer também devido à atresia, quando há comprometimento da qualidade do folículo e do controle meiótico.

Em equinos, os oócitos que apresentam CCs compactas e cromatina difusa são provenientes de folículos viáveis, porém imaturos. De maneira geral, a expansão das CCs do oócito está relacionado com atresia folicular. Segundo Hinrichs e Williams (1997), foi observado uma maior taxa de maturação em oócitos com o cumulus expandido do que nos que apresentavam cumulus compacto, contrariando as expectativas. Portanto, pode-se inferir que os oócitos com cumulus expandido, provenientes de folículos atrésicos apresentam melhor competência para maturação. Além disso, foi encontrado uma menor proporção de oócitos com cromatina compacta em folículos considerados viáveis, do que nos folículos com algum grau de atresia. Acredita-se que a atresia folicular “mimetiza” o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Segundo os dados desta pesquisa, o folículo viável suprime a retomada da meiose e a capacidade de adquirir a competência para maturação.

Lodde et al. (2019) também descreveu uma menor porcentagem de COCs compactos, coletados de folículos menores que 1 cm e entre 1 e 2 cm, que atingiram a MII, quando comparados com COCs expandidos. A expansão das CCs pode estar relacionada com a inabilidade do folículo degenerado em manter o bloqueio meiótico (HINRICHS et al., 1993).

Os oócitos equinos com as CCs expandidas maturam em um período menor do que os outros (HINRICHS et al., 1993). Os equinos apresentam uma população variada de oócitos imaturos, sendo necessário períodos diferentes para que eles alcancem a maturação nuclear e citoplasmática (GALLI et al., 2018). Portanto, ainda não existe uma padronização para o tempo de maturação considerado adequado para esta espécie. Normalmente, o tempo necessário para MIV em equinos varia de 24 a 36 horas (HINRICHS et al., 2005). Sabe-se que a qualidade do oócito é fator determinante no sucesso da produção dos blastocistos (LONERGAN; FAIR, 2015).

A maturação oocitária é um processo complexo e ainda não totalmente elucidado, envolvendo a maturação nuclear, citoplasmática e molecular. De maneira resumida, na maturação nuclear temos a quebra da vesícula germinativa, a reorganização e a segregação cromossômica, com a extrusão de dois corpúsculos polares. Já a maturação citoplasmática envolve mudanças na morfologia e localização das organelas celulares (CROCOMO et al., 2011). Na maturação molecular, o oócito produz e armazena RNA mensageiro (RNAm) que será utilizado futuramente na síntese proteica (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014).

Esses eventos permitem que os oócitos se tornem viáveis para serem fertilizados e originarem novos indivíduos. A maturação nuclear pode ser comprovada através de técnicas de coloração e análise microscópica. Já a maturação citoplasmática é comprovada indiretamente através do sucesso da fertilização do oócito (VASSE, 2015; PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2017). Segundo Uyar; Torrealday; Seli, 2013, a análise da expressão gênica dos COCs pode ser feita por técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR). A maturação nuclear e citoplasmática é indicativa do desenvolvimento oocitário, mas não garante sua competência para o desenvolvimento de um novo ser (FERNANDES et al., 2006).

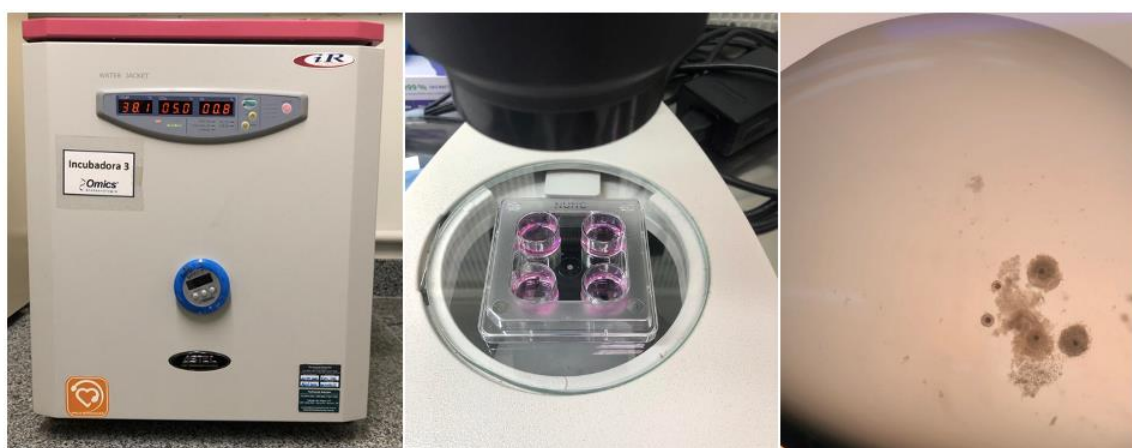


FIGURA 4. COCs equinos após a maturação por 24 horas em placa 4 poços, observados na lupa. Fonte: Acervo pessoal.

O Monofosfato de Adenosina cíclica (AMPc) é uma importante molécula sinalizadora na manutenção do oócito em bloqueio meiótico. Concentrações

elevadas dele no interior do oócito mantém o bloqueio, e sua diminuição leva a retomada da meiose. As enzimas adenilato ciclase (síntese) e fosfodiesterase (degradação) regulam as concentrações de AMPc no interior do oócito (CONTI et al., 2012).

Os níveis elevados de AMPc no oócito suprimem a atividade do Fator Promotor de Maturação (MPF), uma proteína conhecida como reguladora universal do ciclo celular (NURSE, 1990). Ela atua na condensação dos cromossomos, ruptura do envelope nuclear e reorganização das organelas citoplasmáticas. A ativação do MPF promove a retomada da meiose, com a quebra da VG e maturação oocitária (DEKEL, 1996). Portanto, nos oócitos maduros, as concentrações de MPF são maiores do que nos oócitos imaturos (GOUDET et al., 1998).

A inibição da Fosfodiesterase 3 aumenta os níveis de AMPc, ativando a Proteína Quinase A (PKA). A Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (MAPK) também está envolvida no progresso da meiose e catalisa a ativação de outras proteínas quinases, conhecidas como proteínas quinases ativadas pelas MAPKs. Quando as MAPKs estão ativadas, elas promovem a estabilização do MPF nos oócitos. Sua atividade também está relacionada com a variação de AMPc e PKA no oócito (GOTTARDI; MINGOTI, 2009; LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014).

As células do cumulus têm papel fundamental no desenvolvimento oocitário, elas “levam” os metabólitos e nutrientes necessários para o oócito retomar a meiose e atingir a MII. A expansão das CCs é um indicador do sucesso da MIV (LONERGAN; FAIR, 2015).

A taxa de MIV de oócitos equinos é menor que de bovinos. Segundo Lewis et al. (2016), a taxa de maturação de oócitos equinos obtidos em abatedouro foi de 32%, enquanto em oócitos obtidos por aspiração transvaginal foi de 67%. Já em bovinos, a taxa de maturação oocitária *in vitro* se aproxima de 90% (DIAS et al., 2022). Porém, há de se considerar que nos experimentos com ovários obtidos de abatedouro, os oócitos são heterogêneos, provenientes de folículos normais e em atresia (LANDIM-ALVARENGA, 1999).

Em equinos, esta incompetência em retomar e completar meiose, pode estar relacionada com uma deficiência na regulação do MPF e/ou inabilidade para fosforilar o MAPK (GOUDET et al., 1998), sendo que mais estudos são

necessários para esclarecer o porquê de isto ocorrer. Além disso, sabe-se que a competência oocitária para a MIV é influenciada pelo estágio de desenvolvimento folicular, no momento da recuperação. Goudet et al. (1998) fez um experimento com maturação oocitária *in vitro* em equinos, tendo obtido os oócitos por aspiração *in vivo*. Foi identificado que a taxa de maturação era menor em oócitos provenientes de folículos aspirados na emergência do folículo dominante, do que nos oócitos obtidos no final do desenvolvimento do folículo dominante. Portanto, inferiram que a atresia dos folículos subordinados, devido à presença do folículo dominante, pode “aumentar” a competência oocitária.

A idade materna avançada está associada com declínio da fertilidade, influenciando a qualidade oocitária e podendo causar alterações de morfologia, expressão gênica e potencial de desenvolvimento (CARNEVALE; KATANDI; FRESA, 2020). Catandi et al. (2021) demonstrou que éguas idosas apresentam um declínio na atividade metabólica oocitária e embrionária, prejudicando a fertilidade delas.

Nos experimentos de MIV de equinos, normalmente trabalhamos com folículos entre 10 e 30 mm. Os oócitos provenientes de folículos menores que 10 mm de diâmetro apresentam menor capacidade de atingir a maturação nuclear. Já os oócitos provenientes de folículos com mais de 30 mm de diâmetro, podem estar em estágios já avançados de maturação. O ideal para os experimentos de MIV são os oócitos que se encontram na fase de maturação nuclear conhecida como vesícula germinativa (VG) ou quebra da vesícula germinativa (QVG), por poderem retomar a meiose (HINRICHS et al., 1993; CURCIO et al., 2006a).

2.2.1 Maturação nuclear

Quando ocorre a retomada da meiose, o envelope nuclear se desfaz e os cromossomos iniciam sua condensação, caracterizando a quebra da vesícula germinativa. Com o avançar da meiose os cromossomos se alinham na placa metafásica da 1ª divisão da meiose (metáfase I, MI). Ocorre a redução do número de cromossomos pela metade, com a eliminação do 1º corpúsculo polar (CP). Então, os cromossomos resultantes no oócito entram na 2ª divisão da meiose, formando a placa metafásica II (oócito secundário). Após a fertilização, a MII se completa, com a extrusão do 2º CP (ARAÚJO et al., 2007; PRESTES;

LANDIM-ALVARENGA, 2017). Quando ocorre a ovulação dos equinos, é o oócito secundário que é ovulado.

A 1ª divisão da meiose é fundamental para manter a estabilidade do número de cromossomos da espécie (n). Quando ocorrer a fecundação, o número de cromossomos se restabelece ($2n$). A formação do 1º CP sinaliza o final da meiose I e a formação do 2º CP indica que houve a fertilização do oócito (ARAÚJO et al., 2007). Os oócitos são responsáveis pela transferência dos genes maternos para as próximas gerações.

Para que os oócitos possam ser avaliados com relação a maturação, é necessário que eles sejam desnudados antes das avaliações. As CCs do oócito equino são bastante aderidas à zona pelúcida, diferente de outras espécies. Uma solução de Hialuronidase ou Tripsina – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) pode ser utilizada para facilitar o desnudamento (MCKINNON et al., 2011).

Segundo Hinrichs et al. (1993) e Landim-Alvarenga (1999) a maturação nuclear pode ser classificada, de acordo com a configuração cromossômica, em:

- VG: núcleo esférico, com carioteca íntegra e cromatina filamentosa.
- QVG: cromatina condensada e ausência de carioteca.
- MI: encontramos na periferia do ooplasma cromossomos arranjados na placa metafásica.
- MII: cromossomos metáfásicos na periferia do ooplasma, com extrusão do 1º CP.
- Degenerado (D): configuração anormal da cromatina.
- Não analisável (NA): não foi visualizada a cromatina.

2.2.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática é caracterizada por mudanças no formato e localização das organelas do oócito. Consiste em uma série de mudanças que preparam o citoplasma para o desenvolvimento embrionário após a fertilização (MCKINNON et al., 2011). Conforme o folículo cresce, a maturação citoplasmática vai ocorrendo. Quando os oócitos são recuperados de folículos menos maduros, a maturação nuclear pode ocorrer, mas eles podem não

apresentar uma maturação citoplasmática adequada para o desenvolvimento de um novo indivíduo (FRANZ et. al, 2003).

Em oócitos imaturos as mitocôndrias e o complexo de Golgi encontram-se na periferia do oócito, e os grânulos corticais próximos ao complexo de Golgi, onde são formados. Nos estágios iniciais da maturação nuclear, também foram encontrados clusters densos de mitocôndrias na periferia do oócito (AGUILAR et al., 2007). De acordo com Fernandes et al. (2006), os oócitos equinos imaturos apresentam grande quantidade de gotículas de lipídeo associadas às mitocôndrias, distribuídas pelo citoplasma. Além disso, o complexo de Golgi estava mais desenvolvido em oócitos imaturos do que nos já maduros.

As gotículas de lipídeo e as mitocôndrias são essenciais para a produção de energia necessária para a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. Com a maturação nuclear, esta grande quantidade de lipídeos se polariza (AMBRUOSI et al., 2009). Nos oócitos maduros, as mitocôndrias e o complexo de Golgi migram para próximo do núcleo, e os grânulos corticais deslocam-se para a periferia dos oócitos que atingirem a maturação, auxiliando no bloqueio a poliespermia (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014). Nos oócitos em MI e MII, foi encontrado um padrão mais disperso das mitocôndrias por todo o oócito (AGUILAR et al., 2007).

Com relação às mitocôndrias, elas têm papel fundamental no metabolismo energético oxidativo, sendo responsáveis pela síntese de adenosina trifosfato (ATP). Elas se deslocam para locais com alto consumo de energia, sendo este deslocamento essencial para os oócitos em períodos importantes do ciclo celular (KRISHER; BAVISTER, 1998; LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014). As mitocôndrias são as organelas mais abundantes no ooplasma, além de serem a principal fonte de energia do oócito (AGUILAR et al., 2007). De acordo com Sun et al., 2001, com a progressão da meiose, em suínos, as mitocôndrias se acumulam na área perinuclear desde a QVG até a anáfase I.

Segundo Landim-Alvarenga (1999), a maturação citoplasmática pode ser influenciada pela presença das CCs, uso de gonadotrofinas no meio de maturação e o tempo de maturação dos oócitos.

2.2.3 Maturação molecular

Importantes acontecimentos na formação de um novo indivíduo, como a maturação oocitária, fertilização e embriogênese inicial são dependentes da transcrição e estoque de Ácido Ribonucleico mensageiro (RNAm) durante o bloqueio meiótico (SIRARD, 2012; CROCOMO; LANDIM-ALVARENGA; BICUDO, 2019; CARNEVALE; KATANDI; FRESA, 2020). A expressão gênica resulta em produtos gênicos necessários para regular os eventos de maturação no folículo e no oócito (CAMPOS-CHILLON et al., 2015). O potencial de desenvolvimento de um embrião depende do potencial de desenvolvimento do oócito que o originou (RODRIGUEZ; FARIN, 2004).

A falta de competência de alguns oócitos maturados *in vitro* pode se relacionar com a composição e abundância dos transcritos de RNAm presentes no oócito (SOUSA; WESTHUSIN; WATSON, 1998; LONERGAN et al., 2003).

O oócito e as CCs estabelecem um “diálogo” entre si, através da expressão de alguns genes para que o oócito se torne maduro, e após a fertilização, ocorra o desenvolvimento embrionário (FEUERSTEIN et al., 2006). A observação das CCs nos traz informações sobre o oócito. A expressão gênica destas células pode predizer sobre a qualidade oocitária e embrionária (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013).

Dentre os muitos genes envolvidos na maturação oocitária, podemos citar alguns de grande importância, como: Ampirregulina (AREG), Conexinas, Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF9), Fosfodiesterase 3A (PDE3A), Hialurona Sintetase 2 (HAS2), Metaloproteinases, Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP15) e Receptores de FSH (FSHR) e LH (LHR) (CROCOMO; LANDIM-ALVARENGA; BICUDO, 2019; BUENO; BASTOS; RECHSTEINER, 2021; HE et al.; 2021).

A AREG se expressa nas células murais da granulosa, é um das mediadoras da ação do LH. Atua também como um mensageiro folicular, promovendo a maturação oocitária e expansão das CCs (FEUERSTEIN et al., 2006; LINDBLOOM et al., 2008; SAYASITH et al., 2013). Em um estudo realizado em bovinos (SUGIMURA et al., 2014), observaram que a AREG em combinação com BMP15, promovem uma melhor qualidade oocitária.

As Conexinas compõem os canais membranosos de comunicação intracelular, permitindo a comunicação entre o oócito e as CCs (BRESNAHAN et al., 2022). A Conexina 37 (Cx37) é uma dessas proteínas, presente nas junções *gap*, entre o oócito e as CCs (FEUERSTEIN et al., 2006). A Conexina 43 (Cx43) está presente nas junções *gap* que permitem a comunicação entre as próprias CCs (ACKERT et al., 2001). A deficiência das conexinas prejudica a fertilidade e a qualidade embrionária (BRESNAHAN et al., 2022). A deficiência da Cx37 também está relacionada com assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática (CARABATSOS et al., 2000; LIMA et al., 2016).

Égua idosas apresentam menor expressão da Cx43 nos oócitos, na corona *radiata* e nas células da granulosa, e menor expressão da Cx37 nas CCs, quando comparadas com éguas jovens. Portanto, a idade avançada pode interferir na comunicação celular (BRESNAHAN et al., 2022). Durante a expansão das CCs ocorrem mudanças nas junções *gap* (DELL'AQUILA et al., 2004). Segundo Marchal et al., 2003, a retomada da meiose é acompanhada pela redução dos níveis de Cx43, nos equinos.

A PDE3A apresenta um importante papel no controle da maturação nuclear do oócito, atuando na hidrólise do AMPc, que se relaciona com a retomada da meiose (FEUERSTEIN et al., 2006; LINDBLOOM et al., 2008). Foram identificadas diferenças no perfil de expressão da AREG e PDE3A em éguas idosas, sugerindo uma maturação oocitária prematura, quando comparadas com animais jovens (CAMPOS-CHILLON et al., 2015).

A HAS2 induz a produção de ácido hialurônico, o principal componente da matriz extracelular das CCs e sua expansão (FEUERSTEIN et al., 2006; UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013), que é essencial para a maturação citoplasmática (DELL'AQUILA et al., 2004). A expressão deste gene se relaciona com a qualidade da maturação oocitária (MCKENZIE et al., 2004) e pode servir como um possível marcador da competência oocitária (ASSIDI et al., 2008).

A BMP15 é integrante de uma família de fatores de crescimento que controlam as funções ovarianas em estágios distintos de desenvolvimento folicular (COSTA et al., 2012). Ele é responsável pela sinalização oocitária, atuando no recrutamento do folículo primordial, proliferação de células da teca e granulosa, promoção da maturação do oócito e comunicação dele com as CCs,

entre outras funções. Além disso, ele influencia a maturação e a qualidade oocitária (WU et al., 2007; SANFINS; RODRIGUES; ALBERTINI, 2018).

Assim como o gene BMP15, o gene GDF9 é expresso durante todo desenvolvimento oocitário. O GDF9 relaciona-se com a expansão das CCs, regulando diversas enzimas envolvidas no processo, criando um ambiente adequado para o desenvolvimento oocitário (YAN et al., 2001; PANGAS; MATZUK, 2005). Ambos se relacionam também com a competência do desenvolvimento oocitário ao final da maturação e atuam de maneira conjunta (RODRIGUEZ; FARIN, 2004; FEUERSTEIN et al., 2006). A expressão deles em oócitos provenientes de éguas jovens é maior do que nos provenientes de éguas idosas (CARNEVALE; KATANDI; FRESA, 2020).

O FSH atua no crescimento folicular e expansão das CCs, além de induzir a expressão dos LHRs (DELL'AQUILA et al., 2004; FEUERSTEIN et al., 2006). Além disso, ele estimula a maturação oocitária, ligando-se aos FSHRs. Segundo Scarlet et al., 2015, os FSHRs estão presentes nas CCs e no tecido luteinizado, sugerindo que o FSH também atua na formação e manutenção do CL.

As Metaloproteinases são responsáveis por algumas partes das alterações estruturais que ocorrem no útero e nos ovários durante o ciclo estral (CURRY; OSTEEN, 2003). A Metaloproteinase de Matriz 1 (MMP1) e a Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP2) são essenciais na remodelação tecidual, que ocorre durante o desenvolvimento folicular (BASTOS et al., 2014).

A expressão dos LHRs se relaciona com a qualidade do oócito (YANG et al., 2005). O LH influencia no aumento do influxo de cálcio para o oócito, expansão das CCs e retomada da meiose (MATTIOLI; BARBONI, 2000). Além disso, há relação entre a expressão das Metaloproteinases e dos LHRs, sugerindo que os LHRs podem sinalizar o início da produção das Metaloproteinases (BASTOS et al., 2014). Em éguas idosas, a expressão dos LHRs diferiu dos animais jovens, sugerindo uma assincronia no início da maturação oocitária (CAMPOS-CHILLON et al., 2015).

Segundo Cox et al., 2015, houve diferenças na expressão gênica de COCs equinos entre animais jovens e idosos, sendo que éguas idosas podem apresentar menor qualidade e competência de desenvolvimento oocitário. O meio de maturação, com a adição de diferentes moléculas, também influencia a expressão gênica no oócito (WATSON, et al., 2000; SHEN et al., 2022). Além

disso, existem diferenças no perfil de expressão gênica de oócitos equinos com o cumulus compacto e expandido (SHEN et al., 2022).



FIGURA 5. Análise da expressão gênica de oócitos equinos. Fonte: Acervo pessoal.

2.3 Bloqueio meiótico em oócitos

O bloqueio meiótico em oócitos equinos imaturos pode ser mantido pelo uso de bloqueadores da meiose (HINRICHS et al., 2002) ou pela manutenção dos mesmos em temperatura ambiente (CHOI et al., 2006b; MARTINO et al., 2014).

As estratégias mais comuns para manter o bloqueio meiótico consistem em manter elevados os níveis de AMPc no interior do oócito, seja pelo uso de análogos do AMPc, ativadores da adenilato ciclase ou inibidores da fosodiesterase. O bloqueio também pode ser mantido utilizando substâncias que inibem a síntese proteica ou a fosforilação ou que atuem nas quinases dependentes de ciclinas (LONERGAN; FAIR, 2015). O mecanismo de ação da manutenção do bloqueio meiótico nos oócitos equinos sem o uso de bloqueadores da meiose, apenas os mantendo em temperatura ambiente, em meio embrionário, ainda não foi esclarecido (MERLO et al., 2022).

Sabe-se que a retirada precoce de COCs imaturos do folículo de alguns mamíferos resulta na espontânea retomada da meiose (METCALF et al., 2020). O uso de bloqueadores da meiose é uma tentativa para melhorar a competência dos oócitos maturados *in vitro*, permitindo que o oócito tenha mais tempo para se capacitar, acumular as moléculas necessárias para o desenvolvimento embrionário e alcançar a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática (FERREIRA et al., 2009; BILODEAU-GOESEELS, 2012; LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014).

A Butirolactona I é um exemplo de bloqueador de meiose, sendo considerado um dos mais seguros e eficientes, inibindo as quinases dependentes de ciclinas (CDKs), incluindo o MPF (HINRICHS et al., 2002). É uma substância natural, isolada do fungo *Aspergillus terreus* (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). O uso de inibidores da meiose na produção *in vitro* de embriões bovinos é bem estabelecido, sendo que a Butirolactona I é capaz de promover o bloqueio da meiose de maneira reversível e não causar danos ao fuso meiótico ou na distribuição dos cromossomos após a MIV (FERREIRA et al., 2009).

Em um estudo realizado por Guemra et al. (2014), foi concluído que a Butirolactona pode ser usada na PM de maneira efetiva para o bloqueio meiótico temporário de oócitos bovinos. Ela não afetou o desenvolvimento embrionário e as taxas de prenhez. Segundo Maziero et al., 2016 o uso de Butirolactona I auxiliou no incremento da taxa de formação de blastocisto e seu uso em associação com Roscovitina, outro inibidor de meiose, pode até melhorar a resistência embrionária a criopreservação.

Hinrichs et al. (2002) fez um estudo com oócitos equinos imaturos (VG), testando diferentes inibidores da meiose (6-Dimetilaminopurina, Butirolactona e Roscovitina). Seus resultados mostraram que estas substâncias podem inibir a retomada da meiose em oócitos com cromatina condensada, porém os oócitos com a cromatina difusa parecem degenerar, mesmo na presença dos inibidores da meiose.

Segundo Franz et. al (2003) e Choi et al. (2006a) a Roscovitina é eficiente em manter o bloqueio meiótico, de maneira reversível, em oócitos equinos imaturos. Sendo mais eficiente em oócitos com o cumulus compacto. Ela não afeta a competência meiótica destes oócitos após a maturação. Além de não provocar nenhum efeito prejudicial na formação dos blastocistos após a ICSI.

Choi et al. (2006b) fez um estudo comparando a manutenção dos oócitos equinos imaturos com o cumulus expandido em meio com Ciclohexamida e Roscovitina, como bloqueadores meióticos, em estufa com 5% gás carbônico (CO₂), a 38,2°C e a manutenção dos mesmos em meio sem inibidor da meiose (M199 modificado) em temperatura ambiente, por 16 a 18 horas. Concluíram que após a incubação com os inibidores da meiose, em oócitos equinos com o cumulus expandido, houve uma redução na formação de blastocistos. Já a incubação no meio sem inibidor da meiose não afetou a competência meiótica ou de desenvolvimento deles.

A manutenção de oócitos equinos compactos em meio M199 modificado, em temperatura ambiente, equivale à cultura deles em meio com Roscovitina, permitindo após a PM, a MIV e a formação de blastocistos (CHOI et al., 2007). Martino et al. (2014) testou a manutenção dos oócitos equinos em meio M199 modificado, sem a adição de bloqueadores da meiose, em temperatura ambiente por 16-18 horas. Foi concluído que a 25°C são mantidos o bloqueio meiótico e a viabilidade dos oócitos.

Dini et al. (2016) fez um estudo sobre a manutenção de oócitos equinos em meio comercial de embrião, por 18 a 20 horas, em temperatura ambiente, antes da MIV. Concluíram que os oócitos podem ser mantidos neste meio sem prejuízo às taxas de maturação ou desenvolvimento do blastocisto. Além disso, estes oócitos precisaram de um menor tempo para chegar na MII do que os oócitos que foram direto para MIV.

A manutenção dos oócitos equinos na PM, durante a noite, pode fazer uma “pré-seleção” dos oócitos mais competentes, melhorando seu desenvolvimento após a ICSI. Os oócitos que degeneram neste período provavelmente são aqueles que apresentam competência de desenvolvimento prejudicada (MERLO et al., 2022).

Em um estudo realizado por Galli et al., 2018, compararam a maturação dos oócitos equinos por 24 a 28 horas e a maturação por 36 horas, precedida de PM 7 a 8 horas no meio H-SOF. Observaram que o maior tempo de MIV, associada a PM, quase dobrou o número de blastocistos após a ICSI. Este tempo a mais que oócito tem parece melhorar a maturação citoplasmática e a competência de desenvolvimento oocitária.

Estudos estão sendo realizados para estabelecer os limites de temperatura para transporte de oócitos equinos, porém se considera prudente que o transporte seja realizado entre 20 e 22°C, não ultrapassando 36 horas (STOUT, 2020).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas em reprodução equina estão avançando nos últimos anos, a principal limitação que encontramos é a disponibilidade de oócitos equinos. A inibição da meiose, seja pelo uso de bloqueadores da meiose, ou então pela manutenção dos oócitos equinos em temperatura ambiente é benéfica, permitindo assim uma melhora da sincronia entre maturação nuclear e citoplasmática.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Testar a viabilidade da manutenção de oócitos em meio de cultivo embrionário comercial disponível no Brasil (Botuembryo), comparando ao meio de cultivo acrescido de inibidor de meiose (Butirolactona), antes da MIV.

4.2 Objetivos Específicos

Determinar o efeito bloqueador do Botuembryo, a 25°C, sobre oócitos equinos imaturos cultivados *in vitro*, comparando com o meio DMEM/F12 acrescido de Butirolactona.

Comparar a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos equinos mantidos em meio embrionário comercial (Botuembryo) e em meio acrescido de Butirolactona.

Verificar possíveis diferenças na expressão gênica dos oócitos mantidos em meio embrionário comercial (Botuembryo) e em meio acrescido de Butirolactona.

5. REFERÊNCIAS*

ACKERT, C. L.; GITTENS, J. E. I.; O'BRIEN, M. J.; EPPIG, J. J.; KIDDER, G. M. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Developmental Biology*, v. 233, n. 2, p. 258-270, 2001.

AGUILAR, J.; MAS, C.; REYLEY, M.; LUDUEÑA, R.; MOUGUELAR, H.; LOSINNO, L. Nuclear maturation and mitochondrial distribution in equine oocytes matured in vitro. *Animal Reproduction*, v. 4, n. 3, p. 88-97, 2007.

ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; BECKER, F.; HINRICHS, K. Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes. *Equine Veterinary Journal*, v. 29, s. 25, p. 47-50, 1997.

AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G. M.; IORGA, A. I.; DE SANTIS, T.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology*, v. 71, n. 7, p. 1093-1104, 2009.

ARAÚJO, C. H. M.; ARAÚJO, M. C. P. M.; MARTINS, W. P.; FERRIANI, R. A.; REIS, R. M. Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 40, n. 4, p. 551-558, 2007.

ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRARD, M. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 79, n. 2, p. 209-222, 2008.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, v. 124, p. 220–228, 2011.

BASTOS, H. B. A.; KRETZMANN, N. A.; SANTOS, G. O.; ESMERALDINO, A. T.; RECHSTEINER, S. F.; MATTOS, R. C.; NEVES, A. P. Gene expression of matrix metalloproteinases and LH receptors in mare follicular development. *Theriogenology*, v. 82, n. 8, p. 1131-1136, 2014.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 4, p. 687-693, 2012.

BRESNAHAN, D. R.; LUPOLE, R. E.; STILZ, C. R.; CARNEVALE, E. M. Effect of Mare Age on Transcript Abundance of Connexins-37 and-43, Zona Pellucida Proteins, and Sperm Binding. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 108, p. 103796, 2022.

*Referências organizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 74p.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. *Manual of Equine Reproduction*. 3. ed. Missouri: Elsevier, 2011. 325 p.

BRÜCK, I.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare. *Anatomy and Embryology*, v. 199, n. 1, p. 21-28, 1999.

BUENO, V. C.; BASTOS, H. B. A.; RECHSTEINER, S. F. Biomarcadores da fisiologia reprodutiva em equinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 45, n. 2, p. 58-66, 2021.

CAMPOS-CHILLON, F.; FARMERIE, T. A.; BOUMA, G. J.; CLAY, C. M.; CARNEVALE, E. M. Effects of aging on gene expression and mitochondrial DNA in the equine oocyte and follicle cells. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, n. 6, p. 925-933, 2015.

CARABATSOS, M. J.; SELLITTO, C.; GOODENOUGH, D. A.; ALBERTINI, D.F. Oocyte–granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Developmental Biology*, v. 226, n. 2, p. 167-179, 2000.

CARNEIRO, G. F. Produção in vivo e in vitro de embriões em equinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 40, n. 4, p. 158-166, 2016.

CARNEVALE, E. M. Advances in collection, transport and maturation of equine oocytes for assisted reproductive techniques. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, v. 32, n. 3, p. 379-399, 2016.

CARNEVALE, E. M.; CATANDI, G. D.; FRESA, K. Equine aging and the oocyte: A potential model for reproductive aging in women. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 89, p. 103022, 2020.

CATANDI, G. D.; OBEIDAT, Y. M.; BROECKLING, C. D.; CHEN, T. W.; CHICCO, A. J.; CARNEVALE, E. M. Equine maternal aging affects oocyte lipid content, metabolic function and developmental potential. *Reproduction*, v. 161, n. 4, p. 399-409, 2021.

CHOI, Y. H.; HOCHI, S.; BRAUN, J.; SATO, K.; OGURI, N. In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. *Theriogenology*, v. 40, n. 5, p. 959-966, 1993.

CHOI, Y. H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Blastocyst development in equine oocytes with low meiotic competence after suppression of meiosis with roscovitine prior to in vitro maturation. *Zygote*, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2006a.

CHOI, Y. H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. *Animal Reproduction Science*, v. 102, n. 1-2, p. 38-47, 2007.

CHOI, Y. H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, v. 66, n. 4, p. 955-963, 2006b.

CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F.; MEHATS, C.; CHUN, S. Y.; HORNER, K.; JIN, J.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 187, n. 1-2, p. 153-159, 2002.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 356, n. 1-2, p. 65-73, 2012.

COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J.; REBOUÇAS, E. L.; SILVA, J.R.V. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seu papel na regulação da oogênese e da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 36, n. 4, p. 225-238, 2012.

COX, L.; VANDERWALL, D. K.; PARKINSON, K. C.; SWEAT, A. Expression profiles of select genes in cumulus-oocyte complexes from young and aged mares. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, n. 6, p. 914-924, 2015.

CROCOMO, L. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Principais genes implicados na aquisição de competência oocitária. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 13, n. 2, p. 275-283, 2019.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 4, p. 542-552, 2011.

CURCIO, B. R.; FREY JUNIOR, F.; BOFF, A. L. N.; LEON, P. M. M.; LINS, L. A.; ALBUQUERQUE, L. P.; RAMBO, G.; NOGUEIRA, C. E. W.; DESCHAMPS, J. C. Recuperação de oócitos eqüinos com cumulus oophorus compacto por curetagem da parede folicular. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n. 4, p. 417-422, 2006a.

CURCIO, B. R.; LEON, P. M. M.; FREY JUNIOR, F.; NOGUEIRA, C. E.; DESCHAMPS, J. C. Equinos: oogênese, foliculogênese e maturação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 30, n. 1/2, p. 28-35, 2006b.

CURRY JR, T. E.; OSTEEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine Reviews*, v. 24, n. 4, p. 428-465, 2003.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Reviews of Reproduction*, v. 1, n. 2, p. 82-88, 1996.

DELL'AQUILA, M. E.; CAILLAUD, M.; MARITATO, F.; MARTORIATI, A.; GÉRARD, N.; AIUDI, G.; MINOIA, P.; GOUDET, G. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2004.

DIAS, S. D. F.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; ROLO, J.; GOMES-RUIVO, P.; OLIANI, A. H.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PINTO-DE-ANDRADE, L. Parameters influencing the maturation of bovine oocyte: a review. *Animal Production Science*, v. 62, p. 751-764, 2022.

DINI, P.; PASCOTTINI, O. B.; DUCHEYNE, K.; HOSTENS, M.; DAELS, P. Holding equine oocytes in a commercial embryo-holding medium: new perspective on holding temperature and maturation time. *Theriogenology*, v. 86, n. 5, p. 1361-1368, 2016.

DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, v. 39, n. 1, p. 65-79, 1993.

DUCHEYNE, K. D.; RIZZO, M.; CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.; DAELS, P. F.; STOUT, T. A. E.; RUJITER-VILLANI, M. In vitro production of horse embryos predisposes to micronucleus formation, whereas time to blastocyst formation affects likelihood of pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 31, n. 12, p. 1830-1839, 2019.

FERNANDES, C. B.; PERES, K. R.; ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. The use of transmission electron microscopy and oocyte transfer to evaluate in vitro maturation of equine oocytes in different culture conditions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 26, n. 4, p. 159-167, 2006.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 145, n. 1, p. 76-80, 2009.

FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R.; GUÉRIF, F.; ROYÈRE, D. Le dialogue ovocyte-cumulus. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, v. 34, n. 9, p. 793-800, 2006.

FRANZ, L.C.; CHOI, Y.H.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL JR, G. E., HINRICHS, K. Effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 125, n. 5, p. 693-700, 2003.

FULKA, J.; OKOLSKI, A. Culture of horse oocytes in vitro. *Reproduction*, v. 61, n. 1, p. 213-215, 1981.

GALLI, C.; COLLEONI, P.; CROTTI, G.; LAZZARI, G. Prolonged in vitro maturation time and increased intensity of piezo pulses during ICSI enhance cleavage and embryo development in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 66, p. 169-170, 2018.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biology of Reproduction*, v. 57, n. 6, p. 1320-1327, 1997.

GÉRARD, N.; ROBIN, E. Cellular and molecular mechanisms of the preovulatory follicle differentiation and ovulation: What do we know in the mare relative to other species. *Theriogenology*, v. 130, p. 163-176, 2019.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: what's new? *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, n. 8, p. 454-460, 2008.

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

GOUDET, G.; BELIN, F.; BÉZARD, J.; GÉRARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in-vitro maturation in the mare. *Molecular Human Reproduction*, v. 4, n. 6, p. 563-570, 1998.

GUEMRA, S.; SANTO, E. S.; ZANIN, R.; MONZANI, P. S.; SOVERNIGO, T. C.; OHASHI, O. M.; LEAL, C. L. V.; ADONA, P. R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus–oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. *Theriogenology*, v. 81, n. 7, p. 982-987, 2014.

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C.; PEREZ, E. G. A.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 2, p. 122-132, 2008.

HE, M.; ZHANG, T.; YANG, Y.; WANG, C. Mechanisms of oocyte maturation and related epigenetic regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 654028, 2021.

HINRICHS, K. Advances in holding and cryopreservation of equine oocytes and embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 89, p.102990, 2020.

HINRICHS, K. The equine oocyte: factors affecting meiotic and developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, v. 77, n. 8, p. 651-661, 2010.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; WALCKENAER, B. E. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes postmortem and relationship to meiotic and

developmental competence. *Biology of Reproduction*, v. 72, n. 5, p. 1142-1150, 2005.

HINRICHS, K.; LOVE, C. C.; CHOI, Y. H.; VARNER, D. D.; WIGGINS, C. N.; REINOEHL, C. Suppression of meiosis by inhibitors of m-phase proteins in horse oocytes with low meiotic competence. *Zygote*, v. 10, n. 1, p. 37-45, 2002.

HINRICHS, K.; SCHMIDT, A. L.; FRIEDMAN, P. P.; SELGRATH, J. P.; MARTIN, M. G. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biology of Reproduction*, v. 48, n. 2, p. 363-370, 1993.

HINRICHS, K.; WILLIAMS, K. A. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biology of Reproduction*, v. 57, n. 2, p. 377-384, 1997.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Estrous cycle and ovulation in the mare. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 161, n. 11, p. 1367-1374, 1971.

KRISHER, R. L.; BAVISTER B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, v. 49, p. 103-114, 1998.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. *Animal Reproduction*, v. 11, n. 3, p. 150-158, 2014.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Produção in vitro de embriões equinos: avanços e limitações. *Arq Fac Vet UFRGS*, v. 27, s. 1, p. 54-89, 1999.

LEWIS, N.; HINRICHS, K.; SCHNAUFFER, K.; MORGANTI, M.; MCG, C. Effect of oocyte source and transport time on rates of equine oocyte maturation and cleavage after fertilization by ICSI, with a note on the validation of equine embryo morphological classification. *Clinical Theriogenology*, v. 8, n. 1, p. 25-39, 2016.

LEY, W. B. *Reprodução em Éguas para Veterinários de Equinos*. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2006. 220 p.

LIMA, L. F.; BRUNO, J. B.; SILVA, A. M. S.; DUARTE, A. B. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. *Reprodução & Climatério*, v. 31, n. 2, p. 93-104, 2016.

LINDBLOOM, S. M.; FARMERIE, T. A.; CLAY, C. M.; SEIDEL JUNIOR, G. E.; CARNEVALE, E. M. Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. *Animal Reproduction Science*, v. 103, n. 1-2, p. 187-192, 2008.

LODDE, V.; COLLEONI, S.; TESSARO, I.; CORBANI, D.; LAZZARI, G.; LUCIANO, A. M.; GALLI, C.; FRANCIOSI, F. A prematuration approach to equine IVM: Considering cumulus morphology, seasonality, follicle of origin, gap junction

coupling and large-scale chromatin configuration in the germinal vesicle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 31, n. 12, p. 1793-1804, 2019.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, n. 4, p. 259-267, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 4, p. 255-268, 2015.

MARCHAL, R.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GÉRARD, N.; MERMILLOD, P.; GOUDET, G. Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biology of Reproduction*, v. 69, n. 3, p. 1013-1022, 2003.

MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; URANIO, M. F.; RUTIGLIANO, L.; NICASSIO, M.; LACALANDRA, G. M.; HINRICHS, K. Effect of holding equine oocytes in meiosis inhibitor-free medium before in vitro maturation and of holding temperature on meiotic suppression and mitochondrial energy/redox potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, n. 1, p. 99-110, 2014.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus–oocyte complex. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 161, n. 1-2, p. 19-23, 2000.

MAZIERO, R. R. D.; GUAITOLINI, C. R. F.; PASCHOAL, D. M.; KIEVITSBOSCH, T.; GUASTALI, M. D.; MORAES, C. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Effect of temporary meiotic attenuation of oocytes with butyrolactone I and roscovitine in resistance to bovine embryos on vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 51, n. 2, p. 204-211, 2016.

MCKENZIE, L. J.; PANGAS, S. A.; CARSON, S. A.; KOVANCI, E.; CISNEROS, P.; BUSTER, J. E. AMATO, P.; MATZUK, M. M. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Human Reproduction*, v. 19, n. 12, p. 2869-2874, 2004.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine Reproduction*. 2. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. 3132 p.

MERLO, B.; PRETE, C. D.; MARI, G.; IACONO, E. Overnight holding aids in selection of developmentally competent equine oocytes. *Animal Reproduction Science*, v. 245, p. 107071, 2022.

METCALF, E. S.; MASTERSON, K. R.; BATTAGLIA, D.; THOMPSON, J. G.; FOSS, R.; BECK, R.; COOK, N. L.; O'LEARY, T. Conditions to optimise the developmental competence of immature equine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 32, n. 11, p. 1012-1021, 2020.

MORRIS, L. H. A. The development of in vitro embryo production in the horse. *Equine Veterinary Journal*, v. 50, n. 6, p. 712-720, 2018.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, v. 344, p. 503-508, 1990.

PANGAS, S. A.; MATZUK, M. M. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biology of reproduction*, v. 73, n. 4, p. 582-585, 2005.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p. 1193-1210, 2001.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. *Obstetrícia Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 211 p.

RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, n. 2, p. 55-67, 2004.

SANFINS, A.; RODRIGUES, P.; ALBERTINI, D. F. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 35, n. 10, p. 1741-1750, 2018.

SAYASITH, K.; LUSSIER, J.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Human chorionic gonadotropin-dependent up-regulation of epiregulin and amphiregulin in equine and bovine follicles during the ovulatory process. *General and Comparative Endocrinology*, v. 180, p. 39-47, 2013.

SCARLET, D.; WALTER, I.; HLA VATY, J.; AURICH, C. Expression and immunolocalisation of follicle-stimulating hormone receptors in gonads of newborn and adult female horses. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 9, p. 1340-1348, 2015.

SHEN, Y.; DAVSHILT, T.; REN, H.; WANG, X.; YI, M.; TSEWEENDOLMAA, U.; TIAN, S.; DUGARJAV, M.; BOU, G. Difference in expressional profile of compact and expanded-type equine cumulus-oocyte-complexes. 2022, 18 p. Disponível em SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3962012>, 2022. Acesso em: 10 de dezembro de 2022.

SIRARD, M. A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 148-155, 2012.

SOUSA, P. A.; WESTHUSIN, M. E.; WATSON, A. J. Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 49, n. 2, p. 119-130, 1998.

SQUIRES, E. L. Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 31, n. 12, p. 1753-1757, 2019.

STOUT, T. A. E. Clinical application of in vitro embryo production in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 89, p. 103011, 2020.

SUGIMURA, S.; RITTER, L. J.; SUTTON-MCDOWALL, M. L.; MOTTERSHEAD, D. G.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R.B. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Molecular human reproduction*, v. 20, n. 6, p. 499-513, 2014.

SUN, Q. Y.; WU, G. M.; LAI, L.; PARK, K. W.; CABOT, R.; CHEONG, H. T.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE*, v. 122, n. 1, p. 155-163, 2001.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, v. 99, n. 4, p. 979-997, 2013.

VASSE, E. *Effect of age and media on the quality and developmental abilities of equine oocytes from slaughterhouse ovaries*. 2015. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utrecht, Utrecht, 2015.

WATSON, A. J.; SOUSA, P.; CAVANEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 2, p. 355-364, 2000.

WU, Y.T.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X.E.; XU, J.; ZHU, X.M.; LUO, Q.; HUANG, H.F. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Human Reproduction*, v. 22, n. 6, p. 1526-1531, 2007.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, v. 15, n. 6, p. 854-866, 2001.

YANG, S.H.; SON, W. Y.; YOON, S.H.; KO, Y.; LIM, J. H. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Human Reproduction*, v. 20, n. 8, p. 2097-2103, 2005.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido segundo as normas da Equine Veterinary Journal, ISSN 0425-1644, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES quadriênio 2013 – 2016.

<https://beva.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/20423306/homepage/forauthors.html>

Bloqueio meiótico em oócitos de equinos com e sem o uso de inibidores da meiose

M. L. N. Jorge^a, E. S. M. Silva^b, T. T. Dellaqua^c, F. C. Landim^{a*}

^aDepartamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brasil

^bDepartamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, FAMEV, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, Brasil

^cDepartamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências de Botucatu, IBB, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brasil

*Autor para correspondência Tel.: +55 (14) 997611964

E-mail: fernanda.landim@unesp.br

24 RESUMO

25 **Introdução:** A pré-maturação (PM) de oócitos equinos é realizada para que eles
26 possam alcançar a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática, após a
27 maturação *in vitro* (MIV).

28 **Objetivos:** Avaliar a maturação nuclear e citoplasmática e a expressão gênica
29 dos oócitos equinos em meio embrionário equino comercial disponível no Brasil
30 (Botuembryo), comparando ao meio de cultivo acrescido de inibidor de meiose
31 (Butirolactona I), antes da MIV.

32 **Delineamento Experimental:** Foram comparados 3 grupos distintos, em 2
33 momentos. Os grupos foram: Controle, Botuembryo e Butirolactona. No grupo
34 Controle, o momento 1 (M1) corresponde ao momento da obtenção dos oócitos.
35 Nos grupos tratados, o M1 corresponde ao final da pré-maturação (PM), por 20h,
36 com os respectivos produtos. O momento 2 (M2), nos 3 grupos foi ao final da
37 MIV. Foi realizado o Teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$) para avaliação da
38 maturação nuclear e citoplasmática. Para avaliação da expressão gênica, os
39 dados obtidos entre os tratamentos de cada momento foram testados por
40 ANOVA, seguido de comparação dos grupos com o teste de Tukey Kramer
41 (quando dados paramétricos). Já a análise de cada tratamento entre os
42 momentos foi realizada pelo teste t-Student. As diferenças foram consideradas
43 significativas quando $P < 0,05$.

44 **Métodos:** Utilizaram-se 149 oócitos equinos, alguns foram avaliados quanto a
45 maturação nuclear e citoplasmática pela microscopia confocal e outros seguiram
46 para análise da expressão gênica, que foi realizada por RT-qPCR. Nos oócitos
47 foram analisados os genes: BMP15, Cx37, GDF9 e MMP2; e nas células do
48 cumulus (CCs): AREG, Cx43, HAS2, FSHR e LHR.

49 **Resultados:** Na avaliação da maturação nuclear e citoplasmática, foi
50 encontrado no grupo Butirolactona o maior percentual de oócitos imaturos no
51 M1, maior percentual de oócitos maduros no M2, com ausência de citoplasma
52 imaturo neste momento, e menor percentual de degeneração entre os grupos
53 que passaram pela PM. Na análise da expressão gênica, foi observado que o
54 grupo Butirolactona apresentou indícios de maturação molecular acelerada com
55 alta expressão de AREG e HAS2 no M1, e diminuição da abundância desses
56 valores no M2. Por outro lado, a análise da expressão gênica de diversos fatores
57 expressos tanto pelo oócito quanto pelas CCs indicaram uma superioridade do
58 grupo Botuembryo entre os grupos tratados, já que neste foi observado, no M1,
59 menor abundância de AREG, LHR e HAS2 e maior abundância de FSHR. Já no
60 M2, o grupo Botuembryo apresentou maior abundância de GDF9.

61 **Principais limitações:** Disponibilidade de oócitos para a pesquisa.

62 **Conclusão:** Embora a Butirolactona e o Botuembryo tenham apresentado
63 resultados semelhantes na maturação nuclear e citoplasmática e possam ser
64 utilizados para manutenção dos oócitos em bloqueio meiótico, os resultados da
65 maturação molecular indicaram uma superioridade do Botuembryo.

66 **Palavras-chave:** reprodução assistida, fertilidade, ICSI, maturação oocitária,
67 butirolactona

68

69

70

71

72

73

74 **1. INTRODUÇÃO**

75

76 Nos últimos 10 anos, as técnicas de reprodução assistida, como
77 fertilização assistida (ICSI), transferência de oócitos e clonagem, têm ganhado
78 destaque na indústria equina. Para o sucesso destas, a disponibilidade de
79 oócitos saudáveis e com boa competência meiótica é fundamental.

80 A maturação oocitária consiste em 3 processos interligados e
81 mutualmente dependentes, que são a maturação nuclear, a maturação
82 citoplasmática e a maturação molecular. A maturação nuclear é caracterizada
83 pela retomada da divisão meiótica e depende dos níveis intracelulares do fator
84 promotor da maturação (MPF). O MPF é uma proteína conhecida como
85 reguladora universal do ciclo celular¹ que atua na condensação dos
86 cromossomos, ruptura do envelope nuclear e reorganização das organelas
87 citoplasmáticas. Os níveis intracelulares desta proteína são regulados pela
88 atividade do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), e pelas enzimas
89 adenilato ciclase, que faz a síntese do AMPc, e fosfodiesterase, que é
90 responsável pela degradação do AMPc.² A manutenção do bloqueio meiótico no
91 interior de folículos imaturos é fundamental para a sobrevivência dos oócitos e
92 depende da comunicação e transferência de moléculas reguladoras das células
93 da granulosa para o oócito.³

94 A comunicação entre o oócito e as células da granulosa também influencia
95 a maturação citoplasmática e molecular, sendo a maturação citoplasmática
96 caracterizada por modificações na distribuição das organelas citoplasmáticas
97 que preparam o oócito para a fertilização e clivagem.⁴ Na maturação molecular,
98 o oócito e as células do cumulus (CCs) interagem através da expressão de genes

99 necessários para que o oócito se torne competente, e após a fertilização, ocorra
100 o desenvolvimento embrionário.⁵

101 A remoção do oócito do ambiente folicular interrompe a transferência das
102 moléculas reguladoras dos níveis de AMPc, levando a uma retomada
103 espontânea da meiose.³ No caso de oócitos obtidos de folículos imaturos a
104 maturação nuclear, via de regra, não é acompanhada pela maturação
105 citoplasmática, levando a uma diminuição da competência oocitária.⁶ Neste
106 sentido, diversos autores têm trabalhado no desenvolvimento de sistemas de
107 pré-maturação (PM) que conferem ao oócito melhores condições para a
108 sincronização da maturação citoplasmática e nuclear alcançando maior
109 competência de desenvolvimento durante a maturação *in vitro* (MIV).⁷

110 O uso de bloqueadores da meiose é uma alternativa para melhorar a
111 competência dos oócitos maturados *in vitro*, permitindo que eles tenham mais
112 tempo para se capacitar, acumular as moléculas necessárias para o
113 desenvolvimento embrionário e alcançar a sincronia entre a maturação nuclear
114 e citoplasmática.^{3,8,9} A Butirolactona I é um composto que inibe as quinases
115 dependentes de ciclinas (CDKs), incluindo o MPF, sendo considerado um dos
116 bloqueadores da meiose mais seguro e eficiente.¹⁰

117 Esse tempo de PM pode ser utilizado para o transporte dos oócitos, para
118 que o proprietário da égua tenha mais tempo para se decidir pelo garanhão que
119 utilizará e fazer com que o sêmen chegue até o local para ser utilizado, ou para
120 o envio dos oócitos para outros laboratórios que dominem as técnicas de
121 reprodução assistida.¹¹ Nosso País tem dimensões continentais, e muitas vezes
122 o sêmen equino está distante do local que será feito a ICSI. A PM permite este
123 “ganho de tempo” para o transporte.

124 Em equinos, pesquisas foram desenvolvidas mostrando que em oócitos
125 imaturos, a maturação nuclear também pode ser inibida somente com a
126 incubação a temperatura ambiente, sem a utilização de inibidores de meiose.^{12,13}
127 Além disso, estes oócitos também podem ser mantidos em meio comercial de
128 embrião, por 18 a 20 horas, em temperatura ambiente, antes da MIV.¹⁴
129 Entretanto, o mecanismo de manutenção do bloqueio meiótico nestes casos,
130 ainda não foi esclarecido.

131 Os meios para manutenção e transporte de embriões são bastante
132 utilizados em equinos. No entanto, o mesmo não se aplica para o transporte de
133 oócitos. Devido ao baixo número de abatedouros equinos e a sua distribuição
134 heterogênea, em muitos locais os equipamentos e a mão de obra qualificada
135 para trabalhar com a ICSI ou transferência de oócitos (TO) é limitada, sendo
136 necessário o transporte dos oócitos até outros centros reprodutivos.

137 No Brasil, não há dados sobre a viabilidade da manutenção desses
138 oócitos em meio embrionário comercial disponível no País. Sendo assim, o
139 objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução da maturação nuclear,
140 citoplasmática e a expressão gênica em oócitos equinos mantidos por 20 horas
141 (h) em meio para transporte embrionário (Botuembryo), a temperatura ambiente
142 comparando ao meio de cultivo acrescido do inibidor da meiose, Butirolactona I.

143

144 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

145

146 **2.1 Aspectos éticos**

147 Os aspectos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de
148 Experimento Animal (CONCEA) foram considerados em cada etapa desse

149 estudo, tendo sido aprovado pela Comissão Institucional de Ética no Uso de
150 Animais (CEUA), sob protocolo nº 0028/2020.

151 **2.2 Obtenção do material biológico**

152 Foram utilizadas éguas, com histórico desconhecido, abatidas em
153 abatedouro comercial na cidade de Araguari–MG, Brasil. Os ovários foram
154 transportados até o laboratório em um recipiente com solução fisiológica 0,9%
155 (SF, JP Indústria Farmacêutica AS, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) acrescida
156 de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis,
157 Missouri, EUA), em temperatura ambiente. O tempo de transporte foi de
158 aproximadamente 30 minutos. Chegando ao laboratório, o material foi lavado
159 com SF e álcool. Os ovários foram mantidos em Beckers com SF e antibiótico,
160 em temperatura ambiente, até o momento da obtenção dos oócitos.

161 Os oócitos foram obtidos através da curetagem folicular. Os ovários foram
162 dissecados, retirando o tecido conjuntivo e a túnica albugínea, permitindo assim
163 a identificação dos folículos. Foram utilizados folículos entre 10 e 30 mm de
164 diâmetro. Os folículos foram incisados em placa de Petri, onde se procedia a
165 curetagem da parede folicular, seguida da lavagem com uma solução contendo
166 SF, soro fetal bovino 0,01% (SFB, Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis,
167 Missouri, EUA) e 5000 UI heparina (Blau Farmacêutica S.A., Cotia, São Paulo,
168 Brasil). Todo o líquido obtido pela lavagem folicular passou pelo filtro de embrião,
169 reduzindo assim o volume do lavado a ser procurado na lupa. Os oócitos
170 recuperados foram mantidos em meio de lavagem contendo tampão fosfato-
171 salino (PBS, Laborclin, Pinhais, São Paulo, Brasil) e SFB 5% até o momento de
172 seguirem para a incubação. Não foram utilizados oócitos desnudos.

173 **2.3 Delineamento experimental**

174 A maturação oocitária foi realizada no meio *Dulbecco's Modified Eagle*
175 *Medium:Nutrient Mixture* F-12 (DMEM/F12, Gibco, Grand Island, Nova York,
176 Estados Unidos), suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina-
177 Estreptomicina (MB). Os oócitos recuperados foram divididos em 3 grupos:

178 **- Grupo Controle:** Incubação em MB, por 24 h, em estufa a 38,5°C e 5% CO₂
179 em ar.

180 **- Grupo Botuembryo:** Incubação por 20 h em meio comercial para embrião
181 Botuembryo (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), a temperatura ambiente
182 (22 a 25°C), em placa de Petri protegida da luz, seguido de 24 h de incubação
183 em MB, em estufa a 38,5°C e 5% CO₂ em ar.

184 **- Grupo Butirolactona:** Incubação por 20 h em MB contendo 50 µM de
185 Butirolactona I (Enzo Life Sciences, Farmingdale, Nova York, EUA) em estufa a
186 38,5°C e 5% CO₂ em ar, em placa 4 poços, seguido de 24 h de incubação em
187 MB nas mesmas condições atmosféricas e de temperatura.

188 A incubação *in vitro* foi realizada em placas 4 poços (Nunc, Roskilde,
189 Zealand, Dinamarca), com 500 uL de meio, sem óleo mineral.

190 **2.4 Confecção das lâminas e avaliações morfológicas**

191 Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram desnudados por sucessivas
192 pipetagens em Solução de Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich Chemical Co., St
193 Louis, Missouri, EUA). Os oócitos foram lavados e incubados por 15 min em PBS
194 contendo MitoTracker Orange CMTMRos (Thermo Fisher Scientific, Eugene,

195 Oregon, EUA), em temperatura ambiente, no escuro. Os oócitos foram então
196 lavados novamente, e fixados durante a noite a 4°C, em solução de
197 paraformaldeído a 2% em PBS, por pelo menos 12 h.

198 No dia da montagem das lâminas, foi acrescentado a cada eppendorf, com 1
199 mL da solução de paraformaldeído a 2% em PBS contendo os oócitos, 50 uL de
200 Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, EUA). Os oócitos
201 foram então identificados na lupa e transferidos com o mínimo possível de líquido
202 para uma lâmina contendo uma gota de 30 uL de solução de glicerol (Sigma-
203 Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, EUA) contendo 5% de solução com o
204 corante YO-PRO-1 Iodide a 15% (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon,
205 EUA) em PBS + SFB. A gota contendo os oócitos foi então coberta por lamínula
206 e as bordas foram seladas com esmalte. As lâminas ficaram armazenadas a 4°C,
207 na ausência de luz, até o momento da leitura no microscópio confocal a laser.

208 A avaliação da distribuição das mitocôndrias e a visualização dos
209 cromossomos foram realizadas simultaneamente. Os oócitos do grupo Controle
210 foram avaliados antes (M1) e após (M2) a incubação por 24 h. Os oócitos dos
211 grupos Botuembryo e Butirolactona foram avaliados ao final das 20 h de PM (M1)
212 e após a incubação por 24 h (M2).

213 **2.4.1 Maturação citoplasmática**

214 A maturação citoplasmática foi estimada de acordo com o padrão de
215 distribuição das mitocôndrias. As mitocôndrias são organelas que se deslocam
216 para locais com alto consumo de energia, sendo esta distribuição essencial para
217 os oócitos em períodos importantes do ciclo celular.^{3,15} Nos estágios iniciais da
218 maturação nuclear são observados clusters densos de mitocôndrias na periferia

do oócito. Por outro lado, em oócitos maduros, é observado um padrão mais disperso e centralizado das mitocôndrias.¹⁶ Sendo assim, os oócitos foram classificados em imaturos ou maduros de acordo com a distribuição dessas organelas.

2.4.2 Maturação nuclear

Os oócitos foram classificados, dentro de cada grupo, de acordo com o estágio da meiose:^{17,18}

- Vesícula germinativa (VG): núcleo esférico, com carioteca íntegra e cromatina filamentosa (Figura 1a).

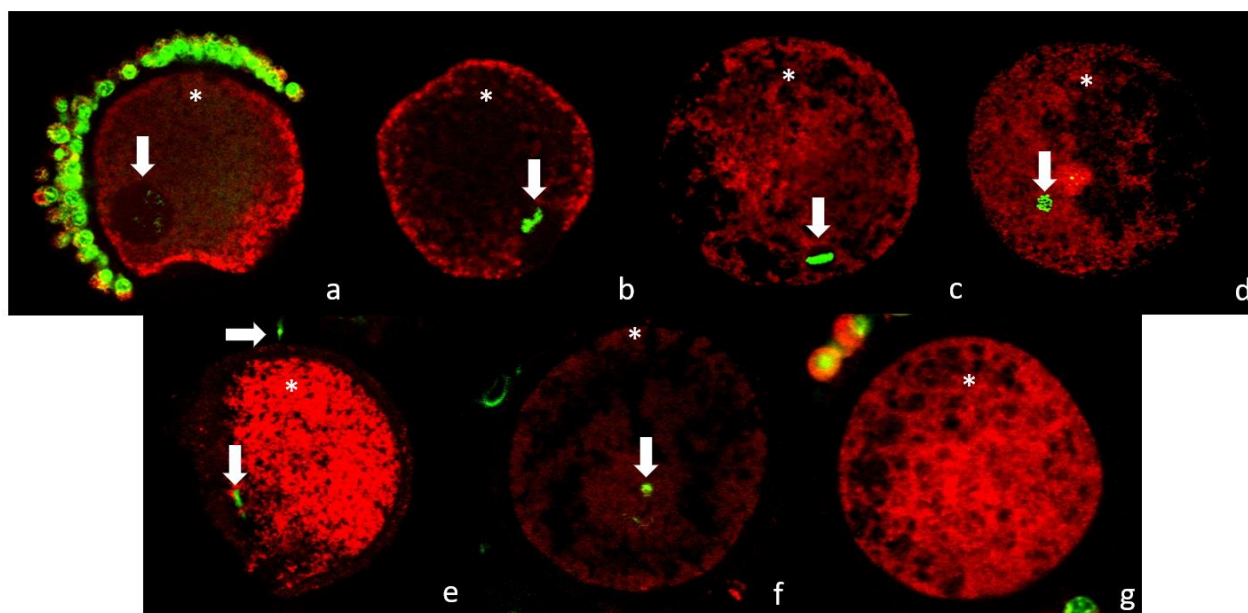
- Quebra da vesícula germinativa (QVG): início da condensação da cromatina e desaparecimento da carioteca (Figura 1b).

- Metáfase I (MI): presença, na periferia do ooplasma, de cromossomos arranjados na placa metafásica (Figuras 1c e 1d).

- Metáfase II (MII): cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma, com extrusão do 1º corpúsculo polar (CP) (Figura 1e).

- Degenerado (D): configuração anormal da cromatina (Figura 1f).

- Não analisável (NA): não foi visualizada a cromatina (Figura 1g).



239

240 **Figura 1.** Na figura 1a temos VG, na figura 1b QVG, ambas com o citoplasma
 241 imaturo. Na figura 1c e d observamos o núcleo em MI. Na figura 1e vemos o
 242 núcleo em MII, com extrusão do 1º CP. Nas figuras 1c, 1d e 1e o citoplasma está
 243 maduro. Na figura 1f temos um ócito degenerado, com núcleo picnótico. Na
 244 figura 1g temos um oócito não analisável, onde não observamos o material
 245 genético. As mitocôndrias foram coradas por MitoTracker Orange CMTMRos
 246 (coloração vermelha e indicadas pelo *) e o material genético por YO-PRO-1
 247 Iodide (coloração verde, indicado pela seta).

248

249 As imagens foram obtidas pelo microscópio de varredura a laser confocal,
 250 LSM 510 Meta, Zeiss. Foram capturados 8 stacks de cada oócito, no aumento
 251 de 40 vezes. Foi utilizado o laser de 543 nm para excitação do marcador
 252 Mitotracker e filtro de emissão entre 574 e 617 nm para captura das imagens. O
 253 laser de 488 nm foi utilizado para excitação do marcador Yo Pro, o filtro de
 254 emissão para captura das imagens variou entre 499 e 531 nm.

255

2.5 Expressão gênica

Após o desnudamento, conforme já descrito, os oócitos e as CCs foram armazenados em eppendorfs, no ultrafreezer -80°C até o momento da análise. A investigação da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) das CCs e oócitos recolhidos ao final de cada etapa da maturação foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), utilizando o sistema Sybr Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, EUA) no equipamento StepOnePlus System, Thermo Fisher Scientific. Resumidamente, 4 pools de CCs e oócitos, com pelo menos 12 COCs dos diferentes grupos, foram submetidas à extração e purificação do ácido ribonucleico (RNA) total com o Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, EUA). As concentrações de RNA total foram mensuradas por NanoDrop 2000 Spectrophotometers, Thermo Fisher Scientific.

Em seguida, o RNA extraído foi tratado com desoxirribonuclease (DNase, Qiagen, Germantown, Maryland, EUA) conforme protocolo do fabricante para eliminação de possível contaminação com ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico. Posteriormente, a transcrição do RNAm em DNA complementar (cDNA) foi realizada com o Kit de transcrição reversa High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, EUA) e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante.

O volume final do mix para PCR foi de 20 µL, em duplicada, e as condições para os ciclos foram 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 15 segundos seguida de anelamento a 60°C por 1 min (40 ciclos). As linhas de base dos dados brutos foram ajustadas para obtenção dos valores do ciclo

de threshold (Ct). A abundância relativa dos genes alvos foi calculada pelo método Ct comparativo (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) e a expressão do gene β -actin (ACTB) foi utilizada como referência para a normalização dos dados, como descrito na literatura.¹⁹ A Tabela 1 contém as sequências utilizadas para os primers das CCs e a Tabela 2, para os oócitos.

Tabela 1. Primers para CCs equinas.

Genes	Sequências	Referências
β -actin (ACTB)	F: CCAGCACGATGAAGATCAAG R: GTGGACAATGAGGCCAGAAT	20 e 21
Ampiregulina (AREG)	F: AGTGCTGATGGGTTTGAGGT R: GGATATTTGTGGTTCGTTGTCA	
Hialurona Sintetase 2 (HAS2)	F: ACAAATGTGGCAGGCGGAAGAG R: GTGATATGTCTCCGTTGGTGGCA	
Conexina 43 (Cx43)	F: TGGCCTTCTTGCTGATCCAA R: TTCTCTGTGGGACGCGAGAG	22
Receptor de LH (LHR)	F: CCACAACCTGATAGCTACCAACAAG R: TGCAGGTGAAATCGGTGAAG	23
Receptor de FSH (FSHR)	F: CCACATCTCCCATCCAAGGA R: TGTGCAATTGGCACCATTG	24

Tabela 2. Primers para oócitos equinos.

Genes	Sequências	Referências
β -actin (ACTB)	F: CCAGCACGATGAAGATCAAG R: GTGGACAATGAGGCCAGAAT	20 e 21
Proteína morfogenética óssea 15 (BMP15)	F: AGCCCTTGACCAATGTAGCAA R: CGGTTGGATCTCAGAGGAAAGT	25
Fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9)	F: GGCCACCTCTACAACACTGTCC R: CCAGGTTAAACAGCAGGTCCAC	
Conexina 37 (Cx37)	F: CATGGAGCCCCGTGTTTGTGT R: ATGCATCCGACAACCAGCAT	22
Metaloproteinase de matriz 2 (MMP2)	F: ATGGCGCCCATTTACACGTA R: AGCTCTTGAATGCCCTTGATG	23

2.6 Análise estatística

A análise estatística da maturação nuclear e citoplasmática foi realizada pelo software Bioestat 5.0[®]. Foi realizado o Teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$) para comparação das proporções de oócitos em cada grupo e em cada momento.

Já para a expressão gênica, os dados da abundância relativa de RNAm de todos os genes avaliados foram testados para normalidade com o teste de Shapiro-Wilk antes da avaliação dos efeitos dos tratamentos. Assim, os dados obtidos entre os tratamentos de cada momento foram testados por ANOVA, seguido de comparação dos grupos com o teste de Tukey Kramer (quando dados paramétricos). Já a análise de cada tratamento entre os momentos foi realizada pelo teste t-Student. Níveis atípicos de expressão gênica (*outliers*) foram identificados pelo teste generalizado ESD (*Extreme Studentized Deviate*) disponíveis no software GraphPad PRISM[®] e excluídos. As análises foram realizadas com o software JMP[®]. Os dados estão apresentados por média (M) $\pm$ erro padrão da média (EPM), e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

As coletas dos ovários foram realizadas entre novembro de 2021 e junho de 2022, totalizando 14 coletas. No período de novembro de 2021 a março de 2022, as coletas foram realizadas para treinamento da técnica de recuperação oocitária por curetagem folicular, totalizando 9 coletas. Neste período obtivemos 264 ovários equinos, sendo que 175 (66,3%) deles apresentavam folículos

dentro do diâmetro especificado para o experimento. Foram curetados 541 folículos, sendo recuperados 307 oócitos. Portanto, a média (M) $\pm$ desvio padrão da média (DP), da taxa de recuperação de oócitos por folículo incisado, expressa em porcentagem foi de $56,75\% \pm 7,3$. A M $\pm$ DP, do número de oócitos obtidos por ovário, foi de $1,72 \pm 0,38$. A M $\pm$ DP, do número de folículos entre 10 e 30 mm por ovário foi de $3,1 \pm 0,81$.

Entre os meses de abril e junho de 2022, foram realizadas 5 coletas para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática e expressão gênica dos oócitos dos grupos Controle, Botuembryo e Butirolactona. Foram coletados 202 ovários, sendo que 122 (60,4%) deles apresentavam folículos dentro do diâmetro especificado para o experimento. Foram recuperados 180 oócitos.

Foram avaliados quanto à maturação nuclear e citoplasmática 75 oócitos. No grupo Controle foram avaliados 24 oócitos, 12 no M1 e 12 no M2. No grupo Botuembryo foram avaliados 27 oócitos, 14 no M1 e 13 no M2. No grupo Butirolactona foram avaliados 24 oócitos, 12 no M1 e 12 no M2. Para a análise da expressão gênica foram armazenados 74 COCs. No grupo Controle foram armazenados 25 oócitos, 12 no M1 e 13 no M2. No grupo Botuembryo foram armazenados 25 oócitos, 12 no M1 e 13 no M2. No grupo Butirolactona foram armazenados 24 oócitos, 12 no M1 e 12 no M2. Níveis atípicos de expressão gênica foram excluídos.

Os resultados da maturação nuclear e citoplasmática obtidos encontram-se na Tabela 3.

339

340

341

Tabela 3. Foi realizado o Teste de Qui-quadrado (χ^2) para comparação das proporções de maturação ($P < 0,05$), nos diferentes grupos e momentos. O número entre parênteses corresponde ao valor total de oócitos.

	VG			QVG		
	M1	M2	P	M1	M2	P
Controle	0 ^c	0	--	33,33 (4)	8,33 (1)	0,0001
Botu	7,14 (1) ^b	7,69 (1)	0,8864	35,71 (5)	0	<0,0001
Butiro	16,67 (2) ^a	0	<0,0001	33,33 (4)	0	<0,0001
P	0,0001	---		0,9462	---	

	MI			MII		
	M1	M2	P	M1	M2	P
Controle	41,67 (5)	75,00 (9)	0,0023	0	8,33 (1)	---
Botu	28,57 (4)	53,85 (7)	0,0054	0	15,38 (2)	<0,0001
Butiro	41,67 (5)	66,67 (8)	0,0163	0	16,67 (2)	<0,0001
P	0,2158	0,1752		---	0,2237	

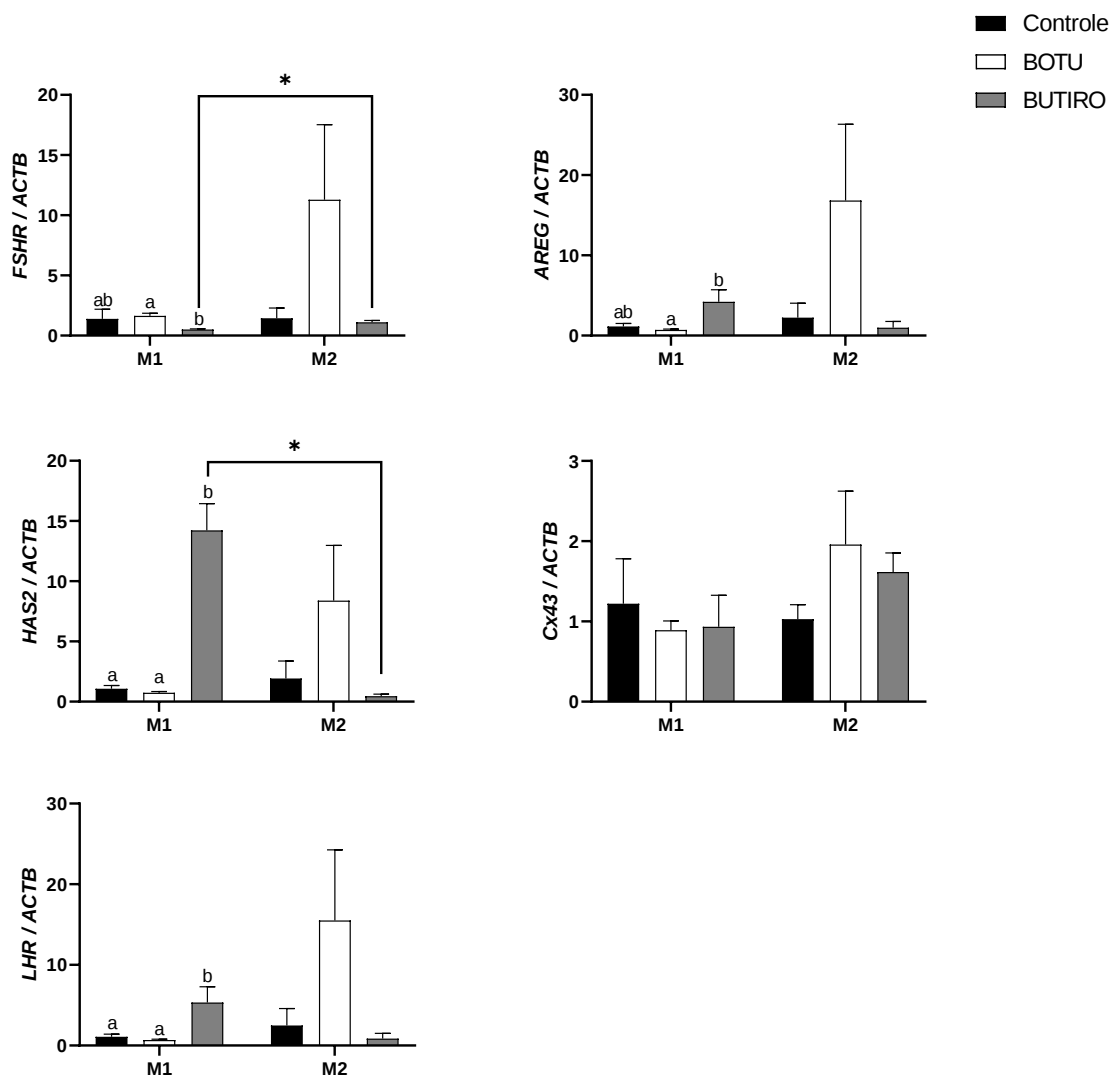
	D			NA		
	M1	M2	P	M1	M2	P
Controle	16,67 (2) ^a	8,33 (1) ^b	0,0953	8,33 (1) ^b	0	---
Botu	7,14 (1) ^a	23,08 (3) ^a	0,0037	21,43 (3) ^a	0	<0,0001
Butiro	0 ^b	16,67 (2) ^{ab}	<0,0001	8,33 (1) ^b	0	---
P	0,0001	0,0329		0,0110	---	

	Cit Im			Cit Mad		
	M1	M2	P	M1	M2	P
Controle	66,67 (8)	16,67 (2) ^a	<0,0001	33,33 (4)	83,33 (10)	<0,0001
Botu	57,14 (8)	15,40 (2) ^a	<0,0001	42,86 (6)	84,60 (11)	0,0002
Butiro	66,67 (8)	0 ^b	<0,0001	33,33 (4)	100 (12)	<0,0001
P	0,6208	0,0003		0,4364	0,3813	

VG: vesícula germinativa; QVG: quebra da vesícula germinativa; MI: metáfase I; MII: metáfase II; D: degenerado; NA: não analisável; Cit Im: citoplasma imaturo; Cit Mad: citoplasma maduro; M1: momento 1; M2: momento 2; Botu: Botuembryo; Butiro: Butirolactona. Letras diferentes (^{a,b,c}) indicam diferenças significativa ($p < 0,05$) entre os percentuais dos grupos.

Os resultados da expressão gênica das CCs encontram-se na Figura 2.

Os resultados da expressão gênica dos oócitos encontram-se na Figura 3.



358

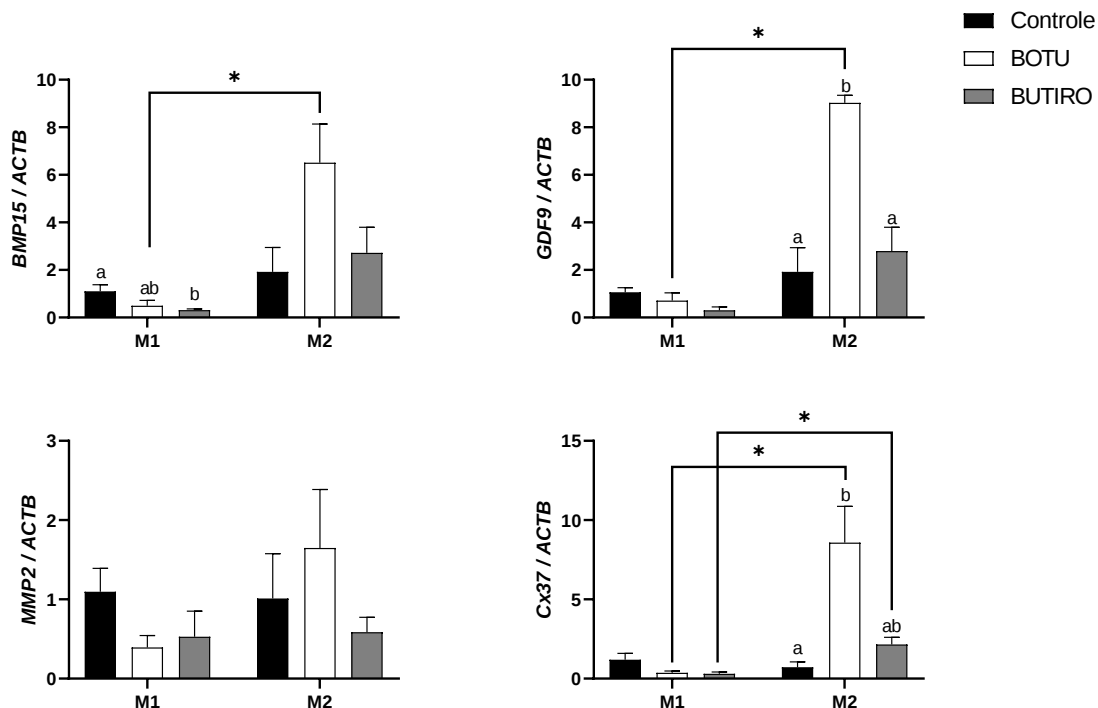
359 **Figura 2.** Resultados de expressão gênica (média e erro padrão da média) de
 360 diferentes genes expressos nas CCs de oócitos equinos, em grupos e momentos
 361 distintos.

362 AREG: Ampiregulina; Cx43: Conexina 43; FSHR: Receptor de FSH; LHR: Receptor de LH; HAS2:
 363 Hialurona Sintetase 2; Botu: Botuembryo; Butiro: Butirolactona; M1: momento 1; M2: momento
 364 2; Botu: Botuembryo; Butiro: Butirolactona.
 365 Letras diferentes (a,b) indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos, no mesmo
 366 momento. A presença do asterisco (*) indica diferença significativa (P<0,05) entre os momentos,
 367 no mesmo grupo.

368
369

370

371



372

373 **Figura 3.** Resultados de expressão gênica (média e erro padrão da média) de
 374 diferentes genes expressos nos oócitos equinos, em grupos e momentos
 375 distintos.

376 BMP15: Proteína Morfogenética Óssea 15; Cx37: Conexina 37; GDF9: Fator de Crescimento e
 377 Diferenciação 9; MMP2: Metaloproteinase de Matriz 2; Botu: Botuembryo; Butiro: Butirolactona;
 378 M1: momento 1; M2: momento 2; Botu: Botuembryo; Butiro: Butirolactona.
 379 Letras diferentes (^{a,b}) indicam diferenças significativa ($P < 0,05$) entre os grupos, no mesmo
 380 momento. A presença do asterisco (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os momentos,
 381 no mesmo grupo.

382

383 4. DISCUSSÃO

384

385 No presente experimento foram utilizados ovários de abatedouro, desta
 386 forma os oócitos foram obtidos de éguas com histórico desconhecido, portanto
 387 vários fatores podem ter interferido na qualidade deles. A dinâmica folicular na
 388 égua é influenciada pela nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo.²⁶

389 Além disso, sabe-se que a idade materna avançada está associada com
 390 declínio da fertilidade, influenciando a qualidade oocitária e podendo causar

391 alterações de morfologia, expressão gênica e potencial de desenvolvimento.²⁷
392 Há um declínio na atividade metabólica oocitária e embrionária em fêmeas
393 equinas idosas, prejudicando a fertilidade delas.²⁸ Portanto, todos estes fatores
394 podem ter influenciado a qualidade dos oócitos recuperados, impactando nos
395 resultados obtidos no presente experimento. Entretanto, tendo estas
396 informações, pode-se inferir que a PM será benéfica especialmente nas éguas
397 idosas, já que o oócito proveniente delas terá um tempo a mais para atingir a
398 sincronia da maturação nuclear e citoplasmática.

399 Os resultados de recuperação oocitária obtidos com a curetagem dos
400 folículos, foram inferiores ao relatado por diversos autores.²⁹ Apesar disso, nossa
401 taxa de recuperação oocitária por folículo incisado (56,75%) se assemelhou aos
402 resultados de Franz et al. (59%).³⁰ Acredita-se que o tempo gasto entre a
403 recuperação dos ovários e a curetagem deles, pela falta de experiência inicial do
404 profissional, possa ter impactado negativamente nestas taxas.

405 Na Tabela 3, é possível observar que o grupo Butirolactona apresentou
406 maior percentual de oócitos em estágio de VG no M1, apresentando também
407 diferença entre os momentos 1 e 2. Com relação a QVG não houve diferença
408 entre os grupos, entretanto houve diferença entre os momentos. Os grupos
409 Botuembyo e Butirolactona não apresentaram oócitos em QVG no M2, já o grupo
410 Controle apresentou um pequeno percentual (8,33%). As fases de VG e QVG
411 representam o início da retomada da maturação nuclear, e uma vez que a
412 simples retirada do oócito já é um estímulo para a retomada da meiose,³¹ é
413 esperado encontrar oócitos em QVG antes do início da MIV, devido ao tempo
414 necessário para a curetagem, identificação e manipulação dos oócitos. Apesar
415 disso, as diferenças entre os grupos indicaram que a PM com Butirolactona foi a

416 mais eficiente em controlar esse processo, uma vez que nesse grupo foi
417 observado a manutenção de oócitos em VG mesmo após o tempo de PM.

418 Por outro lado, quando somamos os percentuais de VG e QVG, que são
419 os oócitos imaturos e aptos para retomar a meiose,^{17,29} no M1, encontramos no
420 grupo Controle 33,33%, no grupo Botuembryo 42,85% e no grupo Butirolactona
421 50%. Novamente fica evidente a retomada espontânea da meiose após a
422 remoção do oócito de seu ambiente folicular. Os resultados mostraram que o
423 bloqueio da meiose entre os grupos que passaram pela PM não diferiu, e foram
424 semelhantes aos observados no grupo Controle, indicando que o percentual de
425 oócitos aptos a MIV é semelhante com ou sem o período de PM testado.

426 Há relatos na literatura de que a PM,^{7,30} com inibidores de meiose, em
427 oócitos que já estão em estágios mais avançados de maturação, como por
428 exemplo com o cumulus expandido, não é eficiente. Infelizmente não temos
429 informações estabelecidas inicialmente sobre a fase folicular em que se
430 encontravam as éguas abatidas, e não foi possível separar os COCs em cumulus
431 compacto e expandido devido ao baixo número de oócitos coletados.

432 O tempo de PM entre 16 e 18 h, com inibidores da meiose, apresentou
433 resultados positivos em oócitos equinos com o cumulus compacto quanto a
434 manutenção do bloqueio da maturação nuclear. No entanto, o uso desse
435 protocolo resultou em baixo índice de produção embrionária.³³ Já a manutenção
436 de oócitos com o cumulus expandido, tanto na presença como na ausência de
437 inibidores de meiose, manteve os oócitos em estágios imaturos e resultou em
438 boas taxas de produção de embriões.¹² Apesar de haver relatos na literatura do
439 êxito da manutenção de oócitos em bloqueio da meiose após incubação em meio
440 comercial para embrião,^{13,34} no presente trabalho, o índice de VG observado no

441 M1, quando foi utilizado o Botuembryo, foi inferior ao grupo Butirolactona. No
442 entanto, quando observamos o estágio de QVG, e/ou agrupamos os dados de
443 VG + QVG, as diferenças entre os grupos tratados desaparecem, demonstrando
444 que ao final das 20 h de incubação, a utilização de Botuembryo a temperatura
445 ambiente ou de Butirolactona, resultou em percentuais de oócitos imaturos
446 semelhantes.

447 A proporção de oócitos em MI, no M1, ao final do período de PM (20h) foi
448 de 41,67% e 28,57% para os grupos Butirolactona e Botuembryo
449 respectivamente. Estes resultados não diferiram estatisticamente do grupo
450 Controle, onde foi observado o percentual semelhante logo após a colheita. A
451 presença de oócitos em MI logo após a recuperação deles pode estar
452 relacionada com a presença de oócitos com o cumulus expandido,¹⁷ obtidos
453 provavelmente de folículos em atresia, ou a excessiva demora para o
454 processamento, com consequente reinício da meiose.

455 Apesar disso, em todos os grupos, houve um aumento significativo do
456 percentual de oócitos em MI no M2, indicando que os protocolos de bloqueio da
457 meiose utilizados foram reversíveis, uma vez que oócitos mantidos em VG ou
458 QVG continuaram o processo de maturação nuclear ao evoluíram para MI.

459 Foi observado um baixo percentual de oócitos em MII, quando comparado
460 aos oócitos em MI. No presente experimento não foi adicionado nenhum
461 suplemento hormonal ao meio de maturação e os oócitos progrediram com a
462 maturação nuclear espontaneamente, sem nenhum estímulo. Desta forma, os
463 baixos índices de MII observados provavelmente estão relacionados a ausência
464 de FSH no meio. Entretanto, neste experimento, não utilizamos o FSH exógeno,

465 porque queríamos avaliar o período de incubação em si, e o que ele poderia
466 ocasionar nos oócitos, e a retomada ou não da meiose.

467 Em um experimento realizado na Bélgica,¹⁴ oócitos equinos foram
468 incubados em DMEM/F12, após PM por 20 h realizada em meio comercial de
469 embrião na temperatura de 25°C. Após a PM os oócitos foram observados com
470 22, 24 e 28 h de maturação em DMEM/F12 sem adição de hormônios e se
471 constatou que os maiores índices de maturação nuclear (MII) foram observados
472 após 28 h de incubação, independente do grupo estudado. Sendo assim,
473 acreditamos que no presente experimento, o tempo de maturação de 24 h pode
474 não ter sido suficiente para que os oócitos atingissem o estágio de MII. De fato,
475 outros trabalhos com oócitos equinos também demonstram que um maior tempo
476 de MIV é necessário para que os oócitos atinjam o estágio de MII.^{13,16,33} Em um
477 estudo realizado previamente,¹⁷ com 24 h de maturação de oócitos compactos,
478 foi encontrado 37% de oócitos em MI e 35% em MII, com 32 h o percentual de
479 oócitos em MII foi de 72%. Sabe-se que oócitos com o cumulus compacto
480 demoram mais tempo para atingir a MII, podendo ser necessário 32 h de
481 maturação.¹⁷ Como não classificamos os oócitos levando em consideração a
482 expansão das CCs, não temos como afirmar se a maioria dos oócitos
483 apresentava cumulus compacto, o que poderia ter relevância na explicação do
484 baixo percentual de oócitos em MII.

485 No M2 também não foi observada diferença estatística entre os 3 grupos,
486 no percentual de oócitos que retomaram a meiose. A PM não parece ter
487 interferido na competência meiótica destes oócitos independente do tratamento.
488 Quando somamos o percentual de oócitos em MI e MII, no M2, vemos que no
489 grupo Controle obtivemos 83,33%, no grupo Botuembryo, 69,23% e no grupo

490 Butirolactona 83,34%. O grupo Botuembryo e o grupo Butirolactona
491 apresentaram resultados semelhantes no percentual de oócitos que retomaram
492 a meiose, e esses resultados não foram diferentes do observado no grupo
493 Controle, demonstrando que os dois métodos de bloqueio da meiose foram
494 eficientes. Além disso, foi observada diferença entre os momentos 1 e 2 na
495 porcentagem de oócitos que atingiram MI e progrediram para MII, resultando em
496 um maior percentual de oócitos maduros no M2. Portanto, quando analisamos a
497 soma de MI e MII, vemos que a PM não interferiu na retomada da meiose, o que
498 era esperado.

499 Com relação a degeneração oocitária durante o cultivo, houve diferença
500 entre os grupos nos 2 momentos. O maior percentual foi encontrado no grupo
501 Controle demonstrando um efeito direto da qualidade dos oócitos recuperados e
502 não do processo de PM. Após a PM, não foram observados oócitos degenerados
503 no grupo Butirolactona, o que reforça a baixa toxicidade do uso deste bloqueador
504 da meiose. No M2 o maior percentual de oócitos degenerados foi encontrado no
505 grupo Botuembryo. Esta degeneração pode estar relacionada a formulação dos
506 meios, uma vez que o meio DMEM/F12 é um meio muito mais rico em
507 comparação ao Botuembryo.

508 Os resultados do presente experimento demonstraram que a
509 Butirolactona apresentou o menor percentual de degeneração, tanto no M1 como
510 no M2. Em um estudo realizado previamente, apenas com oócitos com CCs
511 compactas,¹⁰ foi concluído que a maturação em meio com Butirolactona
512 contendo 50 μ M não foi eficiente em manter o bloqueio meiótico. Já no meio
513 contendo 100 μ M de Butirolactona o bloqueio meiótico foi mantido, entretanto o
514 percentual de degeneração foi alto (69%). Nesse estudo, até a coleta de todos

os oócitos, eles foram mantidos em meio com 100 μ M de Butirolactona. Nossos resultados mostram que a PM, por 20 h, dos oócitos em meio contendo 50 μ M foi eficiente em manter o bloqueio meiótico, além disso o percentual de oócitos degenerados deste grupo após a maturação foi menor entre os grupos tratados.

Houve diferença também no percentual de oócitos não analisáveis. Estas diferenças só foram visíveis no M1, sendo que os grupos Controle e Butirolactona apresentaram resultados semelhantes e inferiores ao grupo Botuembryo. Estes resultados demonstram que apesar dos níveis de bloqueio e retomada da meiose terem sido semelhantes entre os dois tratamentos, a PM com a Butirolactona resultou em um menor percentual de oócitos degenerados e não analisáveis em comparação ao Botuembryo.

Também foram observadas diferenças entre o M1 e o M2, nos 3 grupos, em relação aos oócitos degenerados. Sendo que após a MIV, os grupos tratados apresentaram maior percentual de oócitos degenerados (Botuembryo 23,08% e Butirolactona 16,67%) em relação ao grupo Controle (8,33%). Este fato pode estar relacionado ao longo tempo de manutenção dos oócitos tratados em cultivo, que foi de 44 h (20 h de PM acrescido de 24 h de MIV). Em um estudo realizado na Itália,³⁵ com a maturação de oócitos equinos, o percentual de degeneração encontrado utilizando a mesma combinação de 20h de PM, em meio H-SOF em temperatura ambiente, e 24 h de MIV resultou em maior percentual de degeneração (54,5%) do que no presente trabalho.

Entre os oócitos não analisáveis, foi observado diferença entre o M1 e o M2 somente no grupo Botuembryo, com o maior percentual no momento M1, após a PM. Portanto, sugere-se a adequação do tempo de permanência dos oócitos na PM para obtenção de resultados mais consistentes.

540 Ao observarmos a maturação citoplasmática, constatou-se diferenças
541 estatísticas entre os momentos, sendo que no M1 foi observado uma maior
542 porcentagem de oócitos com citoplasma imaturo e no M2 a maior parte dos
543 oócitos apresentava citoplasma maduro independente do grupo. Além disso, no
544 M2 foram encontradas diferenças somente em relação a porcentagem de oócitos
545 com citoplasma imaturo, sendo o grupo Botuembryo semelhante ao grupo
546 Controle. No grupo Butirolactona não foram encontrados oócitos com o
547 citoplasma imaturo no M2, mostrando que 100% dos oócitos atingiram a
548 maturação citoplasmática após a MIV, o que era esperado.

549 A avaliação da distribuição mitocondrial em oócitos imaturos é útil para
550 checar a viabilidade deles.¹⁶ Entretanto, no M2, não houve diferença estatística
551 entre os grupos para o citoplasma maduro, indicando que a manutenção dos
552 oócitos, durante a PM, não prejudicou a maturação citoplasmática dos oócitos,
553 resultado semelhante já relatados em estudo prévio.¹³

554 Quando combinamos os resultados de maturação nuclear e
555 citoplasmática observamos que, nos 3 grupos o maior percentual de oócitos
556 estava em MI e MII, no momento 2, assim como o maior percentual de citoplasma
557 maduro encontrava-se também neste momento. Resultados semelhante a estes
558 já foram previamente relatados.¹⁶

559 Os genes BMP15 e GDF9 são genes encontrados no oócito e que estão
560 ligados com a promoção do crescimento folicular e progressão da maturação
561 oocitária.^{36,37} O gene BMP15 apresentou uma elevação de sua abundância entre
562 os momentos 1 e 2 em todos os grupos, mas essa elevação só foi
563 estatisticamente diferente no grupo Botuembryo. Da mesma forma, o gene GDF9
564 também aumentou sua abundância entre os momentos 1 e 2, estando mais

565 evidente no grupo Botuembryo. A expressão destes genes é fundamental para
566 o desenvolvimento folicular por exercerem uma função importante de
567 comunicação com as células da granulosa.³⁷ A expressão dos genes BMP15 e
568 GDF9 é maior em oócitos de éguas jovens do que de éguas idosas,²⁷ entretanto
569 no presente experimento não temos a informação sobre a idade dos animais.
570 Independente disso, o aumento de sua abundância está relacionado com
571 processos importantes para a maturação oocitária como a expansão das CCs e
572 a ovulação.^{5,38} O fato de sua abundância ter aumentado durante o período de
573 incubação dos oócitos, independente da realização de PM, reforça seu
574 envolvimento no processo de maturação, em especial nas modificações que
575 ocorrem nas CCs, mostrando que a PM não interferiu na progressão da
576 maturação oocitária. Adicionalmente podemos inferir que o Botuembryo foi uma
577 boa opção para a manutenção do bloqueio meiótico, uma vez que o crescimento
578 da abundância desses dois genes durante o cultivo foi significativo apenas neste
579 grupo.

580 A comunicação entre as células da granulosa e o oócito através da
581 presença de junções do tipo *gap* está envolvida no crescimento do folículo e na
582 maturação oocitária.³⁹ A Cx37 está presente nas junções *gap*, facilitando a
583 comunicação entre oócito e das CCs,^{5,22} sua deficiência se relaciona com a
584 assincronia da maturação nuclear e citoplasmática.^{39,40} No presente experimento
585 observamos uma elevação na abundância do gene para Cx37 do M1 para o M2
586 nos grupos tratados. Este fato, possivelmente está relacionado a produção desta
587 Conexina nos estágios finais de maturação, em preparação para a finalização da
588 meiose. Embora seja conhecido que o pico pré-ovulatório de LH e o estágio MII
589 de maturação nuclear resultem em uma queda dos níveis de Cx37,³⁹ no presente

590 experimento, não utilizamos hormônios nos meios de maturação, e o período de
591 24 h de MIV parece não ter sido suficiente para que os oócitos atingissem a MII,
592 resultando na manutenção dos níveis elevados de Cx37 nos grupos tratados. A
593 maior expressão, no M2, foi encontrada no grupo Botuembryo o que concorda
594 com o observado com a expressão dos genes BMP15 e GDF9 e indica um
595 prolongamento da manutenção da transmissão de moléculas bioativas entre o
596 oócito e as CCs. Na literatura também foram encontradas diferenças na
597 expressão das Conexinas entre éguas jovens e idosas, sugestivas de menor
598 capacidade de comunicação celular nas éguas idosas.²²

599 A MMP2 é essencial na remodelação tecidual, que ocorre durante o
600 desenvolvimento folicular.²³ No entanto, não houve diferenças na expressão
601 deste gene entre os grupos e momentos.

602 Com relação a expressão gênica nas CCs foram observados resultados
603 conflitantes entre os grupos de PM. A abundância de transcritos de AREG e
604 HAS2, importantes no processo de expansão dos COCs,²⁰ foi maior no grupo
605 Butirolactona, em relação aos outros grupos, já no M1, logo após a PM.
606 Surpreendentemente, ao contrário do que ocorreu nos grupos Controle e
607 Botuembryo, onde a expressão desses fatores aumentou do M1 para o M2, no
608 grupo Butirolactona, essa expressão diminuiu. Não sabemos explicar tal fato,
609 mas ele parece estar associado a uma falha na expansão das células do cumulus
610 neste grupo.

611 A AREG é um dos mediadores da ação do LH, promove a maturação
612 oocitária e a expansão das CCs.^{5,41} No M1, a menor abundância deste transcrito
613 foi observada no grupo Botuembryo, e parece indicar a manutenção do bloqueio
614 a meiose durante a PM. Já no M2, embora sem a ocorrência de diferenças

615 significativas, os maiores valores de expressão também foram encontrados no
616 grupo Botuembryo, indicando que neste grupo ocorreu a retomada da maturação
617 de forma eficiente.

618 A HAS2 induz a produção de ácido hialurônico, principal componente da
619 matriz extracelular das CCs, caracterizando sua expansão.^{5,42,43} No M1, ao final
620 da PM, os níveis de HAS2 foram semelhantes nos grupos Controle e
621 Botuembryo, indicando um bom controle do bloqueio da maturação. Entretanto,
622 no grupo Butirolactona, a abundância de HAS2 foi significativamente superior à
623 dos outros grupos indicando uma expansão antecipada do cumulus, mesmo
624 durante o período de PM. Por outro lado, no M2 a abundância de HAS2 diminuiu
625 no grupo Butirolactona, o que não era esperado. Este comportamento foi
626 conflitante com o observado no grupo Controle e no grupo Botuembryo. Apesar
627 de não terem sido observadas diferenças entre os grupos, no M2, novamente a
628 maior abundância foi observada no grupo Botuembryo.

629 A Cx43 é uma Conexina presente nas junções *gap* que permitem a
630 comunicação entre as próprias CCs,⁴⁴ sendo essencial para que ocorra a
631 manutenção da comunicação entre as células foliculares. No presente
632 experimento não foram observadas diferenças na abundância deste transcrito
633 entre os grupos e nem entre os momentos. Era esperado que durante o período
634 de PM seus níveis fossem semelhantes àqueles observados no grupo
635 Controle,⁴⁵ o que de fato ocorreu. Entretanto após a MIV, a abundância de
636 transcritos para CX43 deveria diminuir, o que não foi observado. Não foi possível,
637 no presente experimento, classificar os oócitos de acordo com o grau de
638 expansão do COCs nos diferentes momentos, uma vez que devido a não adição
639 de FSH ao meio durante a MIV, as CCs apresentaram pouca expansão. Desta

640 forma a manutenção de níveis similares de Cx43 logo após a PM e após as 24
641 h de incubação parece estar associada a essa baixa expansão do COCs.

642 O FSH atua no crescimento folicular e expansão das CCs, além de induzir
643 a expressão dos LHRs.^{5,43} Houve diferença na expressão dos FSHRs, somente
644 no M1, sendo que a menor expressão foi encontrada no grupo Butirolactona. No
645 M2 foi observado um aumento dos níveis desse receptor nos diferentes grupos,
646 sendo significativo apenas no grupo Butirolactona. Na verdade, não era
647 esperado um aumento significativo de FSHR durante o cultivo, uma vez que no
648 período de MIV, o meio utilizado não foi acrescido de FSH exógeno.

649 A expressão dos LHRs se relaciona com a qualidade do oócito.⁴⁶ O LH
650 atua na expansão das CC e retomada da meiose.⁴⁷ No presente experimento foi
651 observada diferença na expressão dos LHR, entre os grupos no M1, sendo a
652 maior abundância observada no grupo Butirolactona. Este resultado reforça o
653 observado com relação a abundância relativa de AREG, que também foi mais
654 alta no grupo Butirolactona, no M1. A abundância de LHR não diferiu
655 estatisticamente entre os M1 e M2, sendo que no grupo Butirolactona houve
656 inclusive uma diminuição dos valores, a qual não foi estatisticamente diferente.
657 É sabido que éguas idosas apresentam diferenças na expressão dos LHRs,
658 quando comparados com éguas jovens, sugerindo que as éguas idosas podem
659 ter uma assincronia no início da maturação oocitária.⁴⁸ Por não termos registros
660 da idade dos animais, isto é um fator que também pode ter influenciado os
661 resultados. Além disso, há diferenças no perfil de expressão gênica de oócitos
662 equinos com o cumulus compacto e expandido.⁴⁹ Como não foi possível fazer
663 esta separação inicialmente, este é outro fator que pode ter influenciado.

O conjunto de resultados do presente experimento demonstrou que o uso do bloqueador da meiose, Butirolactona, e a incubação em Botuembryo a temperatura ambiente, resultou em dados de maturação nuclear e citoplasmática semelhantes, demonstrando que ambos os mecanismos de PM foram eficientes em retardar o reinício da meiose, apresentaram baixos efeitos tóxicos e foi possível a reversão do bloqueio em ambos os casos. De fato, quando observamos o percentual de citoplasma maduro no M2, o grupo Butirolactona apresentou 100% de citoplasma maduro em comparação com 84,60% do grupo Botuembryo.

Entretanto, quando analisamos os dados de expressão gênica das CCs, observamos que apesar das altas taxas de maturação citoplasmática observada no grupo Butirolactona, existem vários indícios de maturação molecular acelerada acontecendo neste grupo, durante o período de PM, ou seja, alta expressão de AREG e HAS2 no M1 e diminuição da abundância desses valores no M2. Por outro lado, a análise da expressão gênica de diversos fatores expressos tanto pelo oócito quanto pelas CCs indicaram uma superioridade do grupo Botuembryo, entre os grupos tratados, no M1, com menor abundância de AREG, LHR e HAS2 e maior abundância de FSHR. Já no M2, o grupo Botuembryo apresentou maior abundância de GDF9.

A Butirolactona tem sido utilizada por diversos grupos para a manutenção dos oócitos, porém seu custo é elevado e é necessário o uso de uma estufa com atmosfera controlada para a realização da PM. Por outro lado, o Botuembryo é um meio para embrião disponível no Brasil, barato, de fácil acesso e que pode ser mantido em temperatura ambiente, sendo uma alternativa para a manutenção e transporte de oócitos em nosso País.

5. CONCLUSÃO

Embora os resultados obtidos com o uso da Butirolactona ou do Botuembryo, em temperatura ambiente, sejam semelhantes em relação a maturação nuclear e citoplasmática, os resultados de maturação molecular demonstraram a superioridade do Botuembryo para manter a qualidade de oócitos e células do cumulus antes da realização de técnicas de fertilização assistida em equinos. Novos estudos devem ser feitos para adequar o tempo máximo de manutenção dos oócitos na PM, bem como dosagem hormonal e tempo de MIV.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp (processo 2020/01646-5); ao CNPq; à CAPES, Brasil (código de financiamento 001); à Omics Biotecnologia Animal; à UFU; ao Frigofava.

REFERÊNCIAS

- ¹Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature. 1990; 344:503-508.
- ²Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. Mol. Cell. Endocrinol. 2012; 356 (1-2):65-73.
- ³Landim-Alvarenga FC, Maziero, RRD. Control of oocyte maturation. Anim. Reprod. 2014;11(3):150-158.
- ⁴Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine Reproduction. 2. ed. Oxford: Wiley-Blackwell. 3132 p, 2011.

- 715 ⁵Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guérif F, Royère D. Le dialogue
716 ovocyte–cumulus. *Gynécol. Obstét. Fertil.* 2006; 34(9):793-800.
717 <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2006.07.023>.
- 718 ⁶Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS.
719 Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical
720 modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*.
721 2009; 71(5):836–848. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>.
- 722 ⁷Lodde V, Colleoni S, Tessaro I, Corbani D, Lazzari G, Luciano AM, Galli C,
723 Franciosi F. A prematuration approach to equine IVM: Considering cumulus
724 morphology, seasonality, follicle of origin, gap junction coupling and large-scale
725 chromatin configuration in the germinal vesicle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2019;
726 31(12):1793-1804. <https://doi.org/10.1071/RD19230>.
- 727 ⁸Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA. Prematuration of
728 bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing
729 meiotic abnormalities after in vitro maturation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod.*
730 *Biol.* 2009; 145(1):76-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.03.016>.
- 731 ⁹Bilodeau-Goeseels S. Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation
732 and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental
733 competence? *Reprod. Domest. Anim.* 2012; 47(4):687-
734 693. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01924.x>.
- 735 ¹⁰Hinrichs K, Love CC, Choi YH, Varner DD, Wiggins CN, Reinoehl C.
736 Suppression of meiosis by inhibitors of m-phase proteins in horse oocytes with
737 low meiotic competence. *Zygote.* 2002; 10(1):37-45.
738 <https://doi.org/10.1017/S096719940200206X>.

- 739 ¹¹HINRICHS K. Advances in holding and cryopreservation of equine oocytes and
740 embryos. J. Equine Vet. Sci., 2020; 89:102990.
741 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102990>.
- 742 ¹²Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K. Holding immature equine oocytes in
743 the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and
744 blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology.
745 2006; 66(4):955-963. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.064>.
- 746 ¹³Martino NA, Dell'Aquila ME, Uranio MF, Rutigliano L, Nicassio M, Lacalandra
747 GM, Hinrichs K. Effect of holding equine oocytes in meiosis inhibitor-free medium
748 before in vitro maturation and of holding temperature on meiotic suppression and
749 mitochondrial energy/redox potential. Reprod. Biol. Endocrinol. 2014; 12(1):99-
750 110. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-99>.
- 751 ¹⁴Dini P, Pascottini OB, Ducheyne K, Hostens M, Daels P. Holding equine
752 oocytes in a commercial embryo-holding medium: new perspective on holding
753 temperature and maturation time. Theriogenology. 2016; 86(5):1361-1368.
754 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.079>.
- 755 ¹⁵Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture
756 environment. Theriogenology.1998; 49:103-114. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00405-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00405-6).
- 757
758 ¹⁶Aguilar J, Mas C, Reyley M, Ludueña R, Mouguelar H, Losinno L. Nuclear
759 maturation and mitochondrial distribution in equine oocytes matured in
760 vitro. Anim. Reprod. 2007; 4(3):88-97.
- 761 ¹⁷Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG. In vitro
762 maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using

- 763 fluorescence microscopy. Biol. Reprod. 1993; 48(2):363-370.
764 <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.2.363>.
- 765 ¹⁸Landim-Alvarenga FC. Produção in vitro de embriões equinos: avanços e
766 limitações. Arq Fac Vet UFRGS. 1999; 27(1):54-89.
- 767 ¹⁹Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–
768 PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- 769 ²⁰Lindbloom SM, Farmerie TA, Clay CM, Seidel Junior GE, Carnevale EM.
770 Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in
771 initiation of equine oocyte maturation. Anim. Reprod. Sci. 2008; 103(1-2):187-
772 192. [https://doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.04.006](https://doi:10.1016/j.anireprosci.2007.04.006).
- 773 ²¹Blanco IDP. Influência da ação da hCG sobre a expressão gênica de
774 eprirregulina, ampirregulina e hialurona sintetase-2 em folículos ovarianos de
775 éguas estimuladas ou não com extrato de pituitária equina. Tese (Doutorado em
776 Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp
777 Botucatu. Botucatu, 88 p. 2011.
- 778 ²²Bresnahan DR, Lupole RE, Stilz CR, Carnevale EM. Effect of Mare Age on
779 Transcript Abundance of Connexins-37 and-43, Zona Pellucida Proteins, and
780 Sperm Binding. J. Equine Vet. Sci. 2022; 108:103796.
781 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103796>.
- 782 ²³Bastos HBA, Kretzmann NA, Santos GO, Esmeraldino AT, Rechsteiner SF,
783 Mattos RC, Neves AP. Gene expression of matrix metalloproteinases and LH
784 receptors in mare follicular development. Theriogenology. 2014; 82(8):1131-
785 1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.033>.
- 786 ²⁴Herrera-Luna CV, Budik S, Aurich C. Gene Expression of ACTH, Glucocorticoid
787 Receptors, 11 β HSD Enzymes, LH-, FSH-, GH Receptors and Aromatase in

- Equine Epididymal and Testicular Tissue. *Reprod. Domest. Anim.* 2012; 47(6):928-935. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01993.x>.
- ²⁵Aguiar FLN, Gastal GDA, Ishak GM, Gastal MO, Teixeira DIA, Feugang JM, Figueiredo JR, Gastal EL. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. *Theriogenology*. 2017; 99:124-133. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.045>.
- ²⁶Gurgel JRC, Viana CHC, Perez EGA, Nichi M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2008; 32(2):122-132.
- ²⁷Carnevale EM, Catandi GD, Fresa K. Equine aging and the oocyte: A potential model for reproductive aging in women. *J. Equine Vet. Sci.* 2020; 89:103022. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103022>.
- ²⁸Catandi GD, Obeidat YM, Broeckling CD, Chen TW, Chicco AJ, Carnevale EM. Equine maternal aging affects oocyte lipid content, metabolic function and developmental potential. *Reproduction*. 2021; 161(4):399-409. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0494>.
- ²⁹Alm H, Torner H, Kanitz W, Becker F, Hinrichs K. Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes. *Equine Vet. J.* 1997; 29(25): 47-50. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05099.x>.
- ³⁰Franz LC, Choi YH, Squires EL, Seidel Jr GE, Hinrichs K. Effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2003; 125(5):693-700. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250693>.

- 812 ³¹Conti M, Andersen CB; Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin J, Tsafiriri
813 A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*
814 2002; 187(1-2):153-159. [https://doi.org/ 10.1016/s0303-7207\(01\)00686-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00686-4).
- 815 ³²Curcio BR, Frey Junior F, Boff ALN, Leon PMM, Lins LA, Albuquerque LP,
816 Rambo G, Nogueira CEW, Deschamps JC. Recuperação de oócitos eqüinos
817 com cumulus oophorus compacto por curetagem da parede folicular. *Ciê. Anim.*
818 *Brasil.* 2006;7(4):417-422.
- 819 ³³Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K. Blastocyst development in equine
820 oocytes with low meiotic competence after suppression of meiosis with
821 roscovitine prior to in vitro maturation. *Zygote.* 2006; 14(1):1-8.
822 <https://doi.org/10.1017/S0967199406003534>.
- 823 ³⁴Diaw M, Salgado RM, Canesin HS, Griedley N, Hinrichs K. Effect of different
824 shipping temperatures (~ 22° C vs.~ 7° C) and holding media on blastocyst
825 development after overnight holding of immature equine cumulus-oocyte
826 complexes. *Theriogenology.* 2018; 111:62-68.
827 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.044>.
- 828 ³⁵Merlo B, Prete CD, Mari G, Iacono E. Overnight holding aids in selection of
829 developmentally competent equine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 2022;
830 245:107071. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107071>.
- 831 ³⁶Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF. High bone
832 morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality
833 oocyte and subsequent embryonic development. *Hum. Reprod.* 2007;
834 22(6):1526-1531. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem029>.
- 835 ³⁷Yan C, Wang P, Demayo J, Demayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner
836 SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone

837 morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian
 838 function. *Mol. Endocrinol.* 2001; 15(6):854-866.
 839 <https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0662>.

840 ³⁸Rodriguez KF, Farin CE. Gene transcription and regulation of oocyte
 841 maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004; 16(2):55-67.
 842 <https://doi.org/10.10371/RD03078>.

843 ³⁹Lima LF, Bruno JB, Silva MAS, Duarte ABG, Figueiredo JR, Rodrigues APR.
 844 Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de
 845 folículos ovarianos. *Reprod. Clim.* 2016; 31(2):93-104.
 846 <https://doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.005>.

847 ⁴⁰Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF. Oocyte–granulosa
 848 cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and
 849 cytoplasmic meiotic competence. *Dev. Biol.* 2000; 226(2):167-179.
 850 <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9863>.

851 ⁴¹Sayasith K, Lussier J, Doré M, Sirois J. Human chorionic gonadotropin-
 852 dependent up-regulation of epiregulin and amphiregulin in equine and bovine
 853 follicles during the ovulatory process. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013; 180:39-47.
 854 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.10.012>.

855 ⁴²Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte
 856 and embryo quality. *Fertil. Steril.* 2013; 99(4):979-997.
 857 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.129>.

858 ⁴³Dell'Aquila ME, Caillaud M, Maritato F, Martoriati A, Gérard N, Aiudi G, Minoia
 859 P, Goudet G. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43,
 860 cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-
 861 oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for

- 862 hyaluronic acid synthesis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004; 2(1):1-13.
 863 <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-44>.
- 864 ⁴⁴Ackert CL, Gittens JEI, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder G.M. Intercellular
 865 communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian
 866 folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 2001; 233(2):258-270.
 867 <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0216>.
- 868 ⁴⁵Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gérard N, Mermillod P, Goudet G. Effect
 869 of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation,
 870 cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression,
 871 and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine
 872 species. *Biol. Reprod.* 2003; 69(3):1013-1022.
 873 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015602>.
- 874 ⁴⁶Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro
 875 maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes
 876 collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum. Reprod.* 2005;
 877 20(8):2097-2103. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei045>.
- 878 ⁴⁷Mattioli M, Barboni B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus–
 879 oocyte complex. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000; 161(1-2):19-23.
 880 [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00218-X).
- 881 ⁴⁸Campos-Chillon F, Farmerie TA, Bouma GJ, Clay CM, Carnevale EM. Effects
 882 of aging on gene expression and mitochondrial DNA in the equine oocyte and
 883 follicle cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015; 27(6):925-933.
 884 <https://doi.org/10.1071/RD14472>.