RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/08/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DO PEPTÍDEO NUTRIURÉTICO DO TIPO C DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS EQUINOS SOBRE A PROGRESSÃO MEIÓTICA

Mariana Degli Esposti

Botucatu
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

EFEITOS DO PEPTÍDEO NUTRIURÉTICO DO TIPO C DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS EQUINOS SOBRE A PROGRESSÃO MEIÓTICA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Unesp, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação Ciências biomoleculares e farmacológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Junior

Botucatu
2025

E77e

Esposti, Mariana Degli

Efeitos do peptídeo nutriurético do tipo c durante a maturação in vitro de oócitos equinos sobre a progressão meiótica / Mariana Degli Esposti. -- Botucatu, 2025

58 p. : fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: José Buratini

1. Pré- MIV de Oócitos Equinos. 2. Holding de Oócitos Equinos. 3. NPPC. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Nome da autora: Mariana Degli Esposti

Atada defesa da dissertação: 29 de Agosto de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Buratini Junior

Presidente e Orientador

Departamento de Fisiologia

Botucatu/ SP

Prof. Dr. Anthony Cesar de Souza Castilho

Membro

Departamento de Fisiologia

Presidente Prudente/SP

Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal

Membro

Departamento de Biotecnologia da reprodução

Pirassununga/SP

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, Onorio Dutra,
que partiu antes de me ver cruzar essa linha, mas que sempre me enxergou com olhos de orgulho.

Foi seu entusiasmo simples, mas genuíno, que me lembrava mesmo nos dias incertos que eu estava exatamente onde deveria estar.

Este trabalho é para você, que talvez não compreendesse os termos acadêmicos, mas compreendia, como poucos, a grandeza da ciência e a força de uma conquista feita com o coração.

Obrigada por acreditar em mim antes mesmo que eu soubesse no que me tornaria.

Sua presença caminha comigo na lembrança, no coração e em cada página desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, por iluminar meus passos e tornar sua presença visível nas entrelinhas do meu caminho.

Aos meus pais, Roberta e Marcílio, meu alicerce mais firme. Obrigada por me ensinarem a celebrar até as pequenas conquistas, por estarem sempre presentes mesmo quando a distância se impôs e por me oferecerem, com amor e coragem, o suporte silencioso que me sustentou nos dias difíceis. Vocês são meu Norte.

À minha irmã, Yasmin, e ao meu cunhado, Gabriel, que sempre recebem com tanto carinho, criando um lar repleto de leveza e acolhimento. A presença de vocês me fez respirar em meio ao turbilhão.

À minha doce afilhada, Manuela, que me preenche com um amor genuíno e encantador, do jeitinho único que só ela sabe. Você é luz, é ternura, é um pedaço do céu na minha vida.

Aos meus avós, João, Maria, Onorio e Cecilia por tudo que são e representam. A sabedoria, os valores e o exemplo de vocês moldaram a pessoa que sou hoje. Carrego cada ensinamento com orgulho e gratidão.

Às minhas amigas, Giovanna e Kemily, por permanecerem comigo além do tempo e da distância. Obrigada por nunca deixarem de comemorar minhas vitórias, mesmo de longe. A amizade de vocês é abraço constante.

À minha amiga Carol, que chegou como colega e se tornou parte essencial da minha jornada. Obrigada por sua paciência infinita, por cada ensinamento e por ser inspiração viva de força e generosidade.

Às amigas com quem compartilhei os últimos seis anos da minha vida, Nathalia e Pâmela, que me acolheram como morada em dias de saudade e incerteza. Obrigada pelo amor, pelo cuidado e pela companhia sincera, vocês foram família quando eu mais precisei, e lar diariamente.

A Nathalia, um agradecimento ainda mais profundo, obrigada por dividir comigo os dias intensos da pesquisa, os choros contidos (e os incontidos), as viagens, as madrugadas, as noites sem dormir, as gargalhadas que salvavam os dias difíceis e os silêncios que falavam mais do

que palavras. Sua presença foi colo, parceria e coragem. Sem você, nada disso teria sido possível.

Ao meu namorado, Vinícius, obrigada por acreditar em mim, e por ser sempre apoio e incentivo, e por me acalmar sempre que preciso.

Ao meu orientador, professor José Buratini, por confiar em meu potencial e permitir que eu crescesse como pesquisadora, cientista e ser humano. Juntamente a empresa IN VITRO equinos, por ser suporte à minha pesquisa.

Agradeço à FAPESP (processo: 2023/07531-3) e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido, essencial para a realização desta pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista, que me acolheu com suas portas abertas e me deu a oportunidade de construir essa trajetória. Levo comigo o conhecimento, as experiências e os laços que aqui encontrei.

A cada pessoa que cruzou meu caminho com generosidade, paciência e presença, o meu mais sincero obrigada. Este trabalho é resultado de muitas mãos invisíveis, de muito afetos silenciosos, e de muito amor envolvido.

LISTA DE ABREVEATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina

BSA – Albumina sérica bovina

CDKs – Ciclinas

COCs – Complexos cumulus-oócito

cGMP – Monofosfato de guanosina cíclico

E2 – Estradiol

FBS – Soro fetal bovino

FIV – Fecundação in vitro

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GV – Vesícula germinativa

GVBD – Rompimento da vesícula germinativa (Germinal Vesicle Breakdown)

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

IA – Inseminação artificial

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (Intracytoplasmic Sperm Injection)

LH – Hormônio luteinizante

MAPK – MAP quinase

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

mRNA – RNA mensageiro

NPR2 – Receptor de Peptídeo Natriurético (Natriuretic Peptide Receptor 2)

OPU – Ovum pick-up (aspiração folicular transvaginal)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PDE3 – Fosfodiesterase 3

PDE3A – Fosfodiesterase 3A

$PGF_2\ \alpha$ – Prostaglandina $F_2\ \alpha$

PIVE – Produção in vitro de embriões

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa após transcrição reversa

SEAPA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

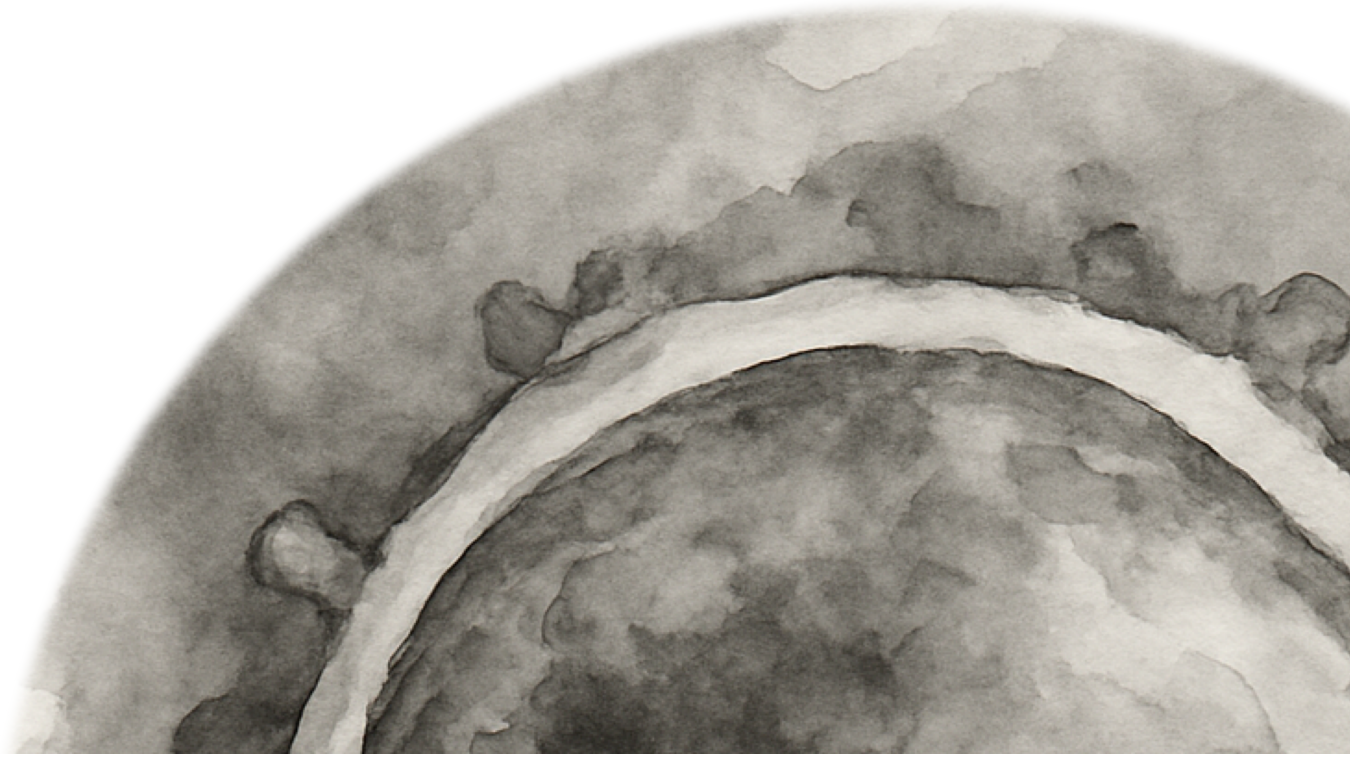
TE – Transferência de embriões

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 10
1. Introdução 2
2. Revisão de literatura 4
2.1 Aspectos Fisiológicos do Ciclo Estral em Éguas 4
2.2 Oogênese e foliculogênese 6
2.3 Fisiologia da Maturação Oocitária 7
2.3.1 Maturação Nuclear 7
2.3.2 Maturação Citoplasmática 10
2.3.3 Maturação Molecular 11
2.3 Pré- Maturação e Maturação *in vitro* 13
CAPÍTULO 2 30
1 Introduction 33
2 Materials and methods 35
2.1 Transvaginal follicle aspiration or ovum pick-up 35
2.2 Experimental design 36
2.3 Assessment of GV chromatin status 37
2.4 Statistical analysis 37
3 Results 38
3.1 Impact of increasing NPPC concentrations on nuclear maturation dynamics during 10 hours of pre-IVM of equine oocytes 38
3.2 Comparative Analysis of NPPC Supplementation and *Holding* Medium on Oocyte Meiotic Arrest after 20 hours of pre-IVM 38
4 Discussion 39
5 References 41
Figures 45

CAPÍTULO 1

Aspectos Biológicos e Moleculares da Maturação Oocitária: Revisão de Literatura



Resumo

As biotecnologias reprodutivas evoluíram significativamente nos últimos anos, especialmente as técnicas de coleta e manipulação de oócitos imaturos para fecundação *in vitro* com o uso da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). A maturação oocitária transforma o oócito primário em um oócito maduro, apto para a fecundação e o desenvolvimento embrionário. Este é um processo complexo que envolve mudanças graduais no ambiente folicular, até que o oócito esteja pronto para retomar a meiose e atingir a fase de metáfase II (MII). O oócito imaturo, em estágio de prófase I, é caracterizado pela presença de uma membrana nuclear intacta que envolve o material genético, denominada vesícula germinativa (VG). A ruptura da VG (GVBD) demonstra a compactação do material genético pronto para reiniciar a retomada de meiose, avançando para as fases seguintes da meiose. As alterações que o oócito sofre até chegar à MII são desencadeadas por vias de sinalização intracelular ativadas a partir do pico pré-ovulatório de LH. Paralelamente, diversas vias metabólicas são ativadas no oócito nesse momento, levando à reorganização das organelas do citoplasma e desencadeando as maturações citoplasmática e molecular. O tratamento de pré-maturação *in vitro* (pré-MIV) é uma técnica utilizada para atrasar a maturação nuclear dos oócitos, com o intuito de preservá-los em estágio de VG, até que as maturações molecular e citoplasmática sejam concluídas. O uso de inibidores fisiológicos como o NPPC (peptídeo natriurético tipo C) tem se mostrado eficaz para prolongar a comunicação entre o oócito e as células do cumulus, permitindo que os oócitos permaneçam em estágio de VG por mais tempo, o que ajuda a preservar sua qualidade e viabilidade. A pesquisa contínua sobre novas técnicas de maturação *in vitro* e o uso de moléculas fisiológicas como o NPPC podem melhorar a qualidade embrionária e aumentar os índices de sucesso reprodutivo, sendo fundamentais para o avanço das biotecnologias reprodutiva

1. Introdução

Atualmente, os equinos desempenham um papel multifuncional em diferentes setores da sociedade, com destaque para suas aplicações nas áreas terapêutica, esportiva e no agronegócio. No âmbito da saúde, destaca-se a equiterapia, utilizada de forma crescente em programas voltados a pessoas com deficiências físicas, neurológicas e psicossociais, onde os benefícios dessas intervenções estão bem documentados na literatura científica, evidenciando ganhos significativos, especialmente no fortalecimento muscular e na reabilitação motora (Molle, 2016; Eguíluz, 2016).

No setor produtivo, a indústria equina tem apresentado expansão contínua, com destaque para as atividades relacionadas ao hipismo e à equitação esportiva. Este segmento movimenta, anualmente, cerca de R$ 16 bilhões, impulsionado pelo crescente investimento em biotecnologias reprodutivas, tais como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) (Gameiro et al., 2018). Além dessas atividades, os equinos continuam exercendo funções estratégicas no transporte, no trabalho rural e em diversas práticas vinculadas ao agronegócio brasileiro. Nesse contexto, a equideocultura destaca-se como um importante vetor de desenvolvimento socioeconômico, promovendo a geração de emprego e renda em diferentes regiões do país. De acordo com a Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SEAPA, 2019), o rebanho equino nacional é composto por aproximadamente cinco milhões de animais, sendo responsável por movimentar, anualmente, cerca de R$ 7,5 bilhões.

A crescente demanda por animais de alto desempenho na indústria equina brasileira tem impulsionado significativamente a aplicação de biotecnologias reprodutivas. Entre as técnicas disponíveis, a transferência de embriões apresenta-se como uma das mais utilizadas, principalmente por possibilitar a produção de múltiplos descendentes de éguas geneticamente superiores em um único ciclo reprodutivo. Além disso, essa biotecnologia apresenta como vantagem a possibilidade de continuidade da carreira esportiva de éguas de alto valor zootécnico, uma vez que a coleta e a transferência dos embriões podem ser realizadas durante o período em que permanecem em competição (Pinto et al., 2017).

O Brasil destaca-se como líder mundial na produção de embriões equinos, sendo responsável por aproximadamente 50% dos embriões transferidos globalmente, com uma média anual de cerca de 25.000 embriões transferidos (Losinno e Urosevic, 2015). Apesar dessa posição de destaque, o desenvolvimento das biotecnologias reprodutivas em equinos ocorreu de forma mais lenta e desigual quando comparado a outras espécies de interesse econômico, como os bovinos (Farin et al., 2006). Entre os principais fatores que limitaram o

avanço das pesquisas e a adoção dessas técnicas, destacam-se as restrições administrativas historicamente impostas por associações de raça, que por muitos anos resistiram à implementação e disseminação das tecnologias de reprodução assistida em equinos (Pimentel et al., 1998; Galli et al., 2006).

Nas últimas cinco décadas, a biotecnologia tem sido amplamente utilizada na reprodução de equinos, promovendo avanços significativos no manejo reprodutivo da espécie (Squires, 2020). O desenvolvimento dessas tecnologias visa superar as limitações naturais associadas à reprodução equina, possibilitando maior eficiência produtiva e genética. O aumento da demanda por animais destinados a modalidades esportivas foi um dos principais impulsionadores da difusão dessas biotécnicas nas últimas décadas (Chalhoub, 2000).

Diversas técnicas têm sido aplicadas com esse objetivo, incluindo a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a transferência de embriões e a clonagem. No entanto a PIVE em equinos ainda apresenta avanços limitados quando comparada às espécies de maior interesse econômico, como bovinos e suínos. Embora a fecundação *in vitro* (FIV) seja amplamente estabelecida como técnica de rotina em diversas espécies, sua aplicação na reprodução equina ainda enfrenta inúmeros desafios técnicos e biológicos (Bezard et al., 1992). Esses entraves estão principalmente relacionados à baixa eficiência da maturação oocitária *in vitro* à dificuldade de capacitação espermática eficaz no ambiente de cultivo (Palmer et al., 1991). Nos equinos, a FIV convencional não apresenta bons resultados, provavelmente devido à baixa capacidade dos espermatozoides de penetrar a zona pelúcida dos oócitos em condições laboratoriais, e essa limitação está associada, sobretudo, à ausência do ambiente fisiológico encontrado *in vivo*, onde o oviduto e suas secreções fornecem um microambiente altamente especializado que regula e favorece a interação entre os gametas, promovendo de forma eficaz os eventos de capacitação espermática. (Tremoleda et al., 2003).

Diante dessa limitação, a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, do inglês *Intracytoplasmic Sperm Injection*) surge como uma alternativa promissora. Ao contrário da FIV convencional, a ICSI contorna a necessidade de interação natural entre o espermatozoide e o oócito, promovendo a introdução direta de um único espermatozoide no citoplasma do oócito maturado (Rader, Choi e Hinrichs, 2016). Essa abordagem tem se mostrado significativamente mais eficiente na reprodução assistida de equinos, permitindo taxas mais altas de fecundação e desenvolvimento embrionário, especialmente quando associada a protocolos otimizados de maturação oocitária *in vitro.*

Entre as principais limitações dos avanços na técnica de PIVE em equinos, destacam-se as dificuldades relacionadas à maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos e à ausência

de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de sustentar de maneira eficiente os estágios avançados de clivagem até o desenvolvimento embrionário inicial (Hinrichs, 2010). Além dos fatores fisiológicos, a logística envolvida na aplicação das biotécnicas reprodutivas em equinos impõe desafios adicionais, especialmente devido à distância geográfica entre os locais de coleta dos oócitos e os laboratórios especializados na manipulação e maturação desses gametas. Nesse cenário, tornou-se imprescindível a utilização de meios específicos para o transporte dos complexos cumulus oócito (COCs), com o objetivo de preservar sua viabilidade e qualidade até o início da MIV.

A manipulação de oócitos fora de seu ambiente folicular exige cuidados rigorosos, uma vez que a retirada dos COCs do interior do folículo implica na perda imediata dos sinais inibitórios presentes no fluido folicular. Esses sinais são responsáveis por manter os oócitos em bloqueio meiótico, na fase de prófase I da meiose I. A interrupção dessa sinalização leva à retomada espontânea da meiose, que pode ocorrer de forma descoordenada, comprometendo a qualidade e assincronia das maturações nuclear, citoplasmática e molecular e, por consequência, o potencial de desenvolvimento embrionário subsequente (Gilchrist, 2011). Para contornar esse desafio, o controle da temperatura é uma das estratégias mais utilizadas na espécie equina, visando a preservação da imaturidade oocitária. A redução da temperatura diminui a atividade metabólica do oócito, promovendo a desaceleração da progressão meiótica e contribuindo para a manutenção de sua viabilidade até que se tenha uma sincronia entre as maturações e elas possam seguir de forma coordenada para a fase de MIV (Dini et al., 2021).

Dessa forma, este capítulo se propõe a apresentar uma revisão de literatura abrangente sobre os principais aspectos fisiológicos que envolvem a reprodução em éguas, com foco no ciclo estral, oogênese, foliculogênese, maturação oocitária e nas particularidades da aplicação das biotecnologias reprodutivas à espécie equina, destacando os avanços e desafios da fecundação *in vitro* nesse contexto.

2. Revisão de literatura

2.1 Aspectos Fisiológicos do Ciclo Estral em Éguas

Os equinos são classificados como animais poliéstricos sazonais, uma vez que sua atividade reprodutiva é regulada principalmente pelo fotoperíodo. O fotoperíodo é definido como o intervalo de tempo diário em que um organismo é exposto à luz natural, ou seja, a duração do dia, dentro de um ciclo de 24 horas (Mckinnon et al., 2011).

O aumento da luminosidade é percebido por fotorreceptores localizados na retina, que enviam sinais ao eixo neuroendócrino pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Aurichab,

3 Referências

ABBASSI L, EL-HAYEK S, CARVALHO KF, WANG W, YANG Q, GRANADOS-APARICI S, MONDADORI R, BORDIGNON V, CLARKE HJ. Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular compartment at ovulation. **Nat Commun** 2021;12: 01-13.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.; QUETGLAS, M.D. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Anim. Reprod. Sci., v. 108,** p. 49-65, 2008.

AERT, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species**. Reproduction Domestic Animals, v. 45, p.** 171-179, 2010.

ALBERTINI DF, COMBELLES CM, BENECCHI E, CARABATSOS MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction 2001**;121: 647–653.

ALEANDRI V, SPINA V, MORINI A. The pineal gland and reproduction. **Hum Reprod Update** 1996;2: 225-235.

ALM H, TORNER H, KANITZ W, BECKER F, HINRICHS K. Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes**. Equine Vet J** 1997;29: 47-50.

APARICIO I. M., GARCIA-HERREROS M., O'SHEA L. C., HENSEY C., LONERGAN P., AND FAIR T. (2011). Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. **Biol Reprod** 84, 910–921.

ASHKENAZI H, CAO X, MOTOLA S, POPLIKER M, CONTI M, TSAFRIRI A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology** 2005;146: 77-84.

AURICHAB, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science,** v.124, n.3, p.220-228, 2011.

BEAUMONT, L., & MANDL, A. M. (1962). The role of the cumulus in the development of the ovum. **Journal of Reproduction and Fertility**, 3(3), 199-207.

BENAMMAR A, DERISOUD E, VIALARD F, PALMER E, AYOUBI JM, POULAIN M, CHAVATTE-PALMER P. The Mare: A Pertinent Model for Human Assisted Reproductive Technologies? **Animals (Basel)** 2021;11.

BERTERO, A., RITROVATO, F., EVANGELISTA, F., STABILE, V., FORTINA, R., RICCI, A.,REVELLI, A., VINCENTI, L. AND NERVO, T. (2017) Evaluation of equine oocytedevelopmental competence using polarized light **microscopy.Reproduction** 153, 775-784

BILODEAU-GOESEELS, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulusenclosed bovine oocytes in vitro. J. **Reprod. Fertil.,** v.97, p.5-11, 1993.

BISOL, J. F. W. Fotoperíodo artificial sobre a atividade reprodutiva de éguas durante a transição outonal. 2007. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2007.

BLOOM, W.; FAWCETT, D.W. A Textbook of Histology. **Chapman & Hall**, p.810-830, 1994.

BURATINI J, DELLAQUA TT, DAL CANTO M, LA MARCA A, CARONE D, MIGNINI RENZINI M, WEBB R. The putative roles of FSH and AMH in the regulation of oocyte developmental competence: from fertility prognosis to mechanisms underlying age-related subfertility. **Hum Reprod Update** 2021;28: 232-254.

BURATINI, J.; SOARES, A.C.S.; BARROS, R.G.; DELLAQUA, T.T.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M.M.; LUCIANO, A.M. Physiological parameters related to oocyte nuclear differentiation for the improvement of IVM/IVF outcomes in women and cattle. Reproduction, **Fertility and Development**, v. 34, n.2, p. 27- 35, 2021.

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. Manual of Equine Reproduction, 3. Ed. Mosby. p.1-7, 2011.

CAMPBELL JS, SEGER R, GRAVES JD, GRAVES LM, JENSEN AM, KREBS EG. The MAP kinase cascade. **Recent Prog Horm Res**. 1995;50:131-59.

CARNEVALE, E.M., et al. (2005). "Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. Department of Biomedical Sciences" **Theriogenology** 64, 519–527.

CHALHOUB, M., et al. (2000). Efeito do número de inseminações artificiais por ciclo sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen eqüino diluído, resfriado a 20°C e transportado**. Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 29(6), 1649-1653.

CHENG FP, FAZELI AR, VOORHOUT WF, TREMOLEDA JL, BEVERS MM & COLENBRANDER B 1998a Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. **International Journal of Andrology** 21 57–66.

CHOI YH, LOVE LB, VARNER DD, 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** 2006;66: 955-963.

CLARKE HJ. Growth and Meiotic Maturation of Mammalian Oocytes: **An Overview**. 2018: 144-152.

COELHO LA, SILVA LA, REWAY AP, BUONFIGLIO DDC, ANDRADE-SILVA J, GOMES PRL, CIPOLLA-NETO J. Seasonal Variation of Melatonin Concentration and mRNA Expression of Melatonin-Related Genes in Developing Ovarian Follicles of Mares Kept under Natural Photoperiods in the Southern Hemisphere. **Animals** 2023;13: 1063.

COLAZO M. G., AND MAPLETOFT R. (2014). Fisiología del Ciclo Estral Bovino. Cienc. **Vet.** 16, 31–46. doi:10.19137/cienvet2014-1623

COLLADO-FERNANDEZ E, PICTON HM, DUMOLLARD R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. Int J Dev Biol, v.56, n.10-12, p.799-808, 2012. Cox E, Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development. In StatPearls; StatPearls Publishing: **Treasure Island**, FL, USA, 2020

CONTI M, HSIEH M, PARK JY, SU YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol** 2006;20: 715-723.

CONTI M, HSIEH M, ZAMAH AM, OH JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Mol Cell Endocrinol** 2012;356: 65-73.

COTICCHIO G., ALBERTINI D. F., AND DE SANTIS L. (2013). Oogenesis. **Oogenesis** 1–353. doi:10.1007/978-0-85729-826-3

DAMIANI P, FISSORE RA, CIBELLI JB, LONG CR, BALISE JJ, ROBL JM, et al. Evaluation of developmental competence, nuclear, and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Mol Reprod** Dev. 1996;45:521-34

DELLAQUA TT, VIGARO RA, JANINI LCZ, DAL CANTO M, RENZINI MM, LODDE V, LUCIANO AM, BURATINI J. Neuregulin 1 (NRG1) modulates oocyte nuclear maturation during IVM and improves post-IVF embryo development. **Theriogenology** 2023;195: 209-216.

DINI, POUYA; PASCOTTINI, OSVALDO BOGADO; DUCHEYNE, KAATJE; HOSTENS, MIEL; DAELS, PETER. Holding equine oocytes in a commercial embryo-holding medium: New perspective on holding temperature and maturation time. **Theriogenology**, 2021.

EDWARDS RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature** 1965;208: 349-351.

EGUÍLUZ MAA. Efeitos da equoterapia e fisioterapia convencional na força muscular de idosos com doença de Alzheimer. 2016.

EYERS, P.A.; LIU, J.; HAYASHI, N.R. et al. Regulation of the G(2)/M transition in Xenopus oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem., v. 28, p. 339-346, 2005.
Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. The EGF Receptor Family 2003: 15-31.

FERNANDES, C. B. (2012). Biotécnicas avançadas em reprodução equina. In B. B. Deminicis, C. B. Martins, & J. B. Siqueira (Eds.), **Tópicos especiais em Ciência Animal I** (pp. 2-10). Alegre: Caufes.

FERREIRA, A. I. T. Reprodução equina. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Porto, Porto, 2009.
FAKHAR-I-ADIL M, ANGEL-VELEZ D, ARAFTPOOR E, AMIN QA, HEDIA M, BÜHLER M, GEVAERT K, MENTEN B, VAN SOOM A, CHUVA DE SOUSA LOPES SM, STOOP D, DE ROO C, SMITS K, HEINDRYCKX B. Biphasic CAPA-IVM Improves Equine Oocyte Quality and Subsequent Embryo Development Without Inducing Genetic Aberrations. Int J Mol Sci. 2025;26(11):5495. doi:10.3390/ijms26125495

Foss, R., Ortis, H. and Hinrichs, K. (2013) Effect of potential oocytetransport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperminjection in the horse**. Equine Vet.** J. 45, Suppl. 45, 39-43.2.

FRANCIOSI F, COTICCHIO G, LODDE V, TESSARO I, MODINA SC, FADINI R, DAL CANTO M, RENZINI MM, ALBERTINI DF, LUCIANO AM. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes**. Biol Reprod** 2014;91: 61.

FRANCIOSI F, LODDE V, GOUDET G, DUCHAMP G, DELEUZE S, DOUET C, TESSARO I, LUCIANO AM. Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. **Mol Hum Reprod** 2012;18: 243-252.

FREIMANN S, BEN-AMI I, DANTES A, RON-EL R, AMSTERDAM A. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2004;324: 829-834.

GAMEIRO A, SANTOS BEDS, BRANDI RA, GAMEIRO AH. Estudo do mercado e produção do cavalo Brasileiro de hipismo no estado de São Paulo. Pubvet 2018;12.

GANDOLFI BTAL, GANDOLFI F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic componentes and their effects on early development. **Theriogenology.** 2001;55:1255-76.

GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. Ovogênese. In: GARCIA, S.M.LAURER DE; FERNÁNDEZ, C.G. **Embriologia**. Porto Alegre: Artmed, v. 3, p. 55-82, 2012

GILCHRIST RB, LUCIANO AM, RICHANI D, ZENG HT, WANG X, VOS MD, SUGIMURA S, SMITZ J, RICHARD FJ, THOMPSON JG. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction** 2016;152: R143-157.

GILCHRIST RB. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev** 2011;23: 23-31.

GILCHRIST, Robert B. Recent insights into oocyte–follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, [S.l.], 14, n. 2, p. 159-177 2011.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. Human **Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, Sugimura S, Smitz J, Richard FJ, Thompson JG. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. Reproduction. 2016 Nov;152(5):R143-57. doi: 10.1530/REP-15-0606. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27422885.

GILCHRIST, ROBERT B.; THOMPSON, JEREMY G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. ***Theriogenology***, New York, v. 67, n. 1, p. 6–15, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.027.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2. ed. Cross Plains: **Equiservices**, 2004.

GINTHER, O. J., Changes in circulating concentrations of inhibin A, estradiol, and progesterone in mares with spontaneous and prostaglandin F2α-induced luteolysis. Biology of **Reproduction,** 1997, 56(3), 607-613.

GIRSH, B. ET AL. (1996). Prostaglandin F2-alpha and its role in luteal regression. Journal of **Reproductive Biology and Endocrinology**, 4(3), 225-234.

GRANOT I, DEKEL N. The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins. **Trends in Endocrinology & Metabolism** 2002;13: 310-313.

GUILLAUME, D.J.; SALAZAR, O.W.; MARTIN, R. Effects of nutrition level in mares' ovarian activity and in Equines puberty. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION: Symposium Session Equine Reproduction, n.16, 2006, Campobasso: **Wageningen Academic Publishers**, p.1-18, 2006.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal. 7ª ed**., São Paulo: Manole, 2004, 503p. LEY, W.B. Reprodução em Éguas para Veterinários de Eqüinos. 1ª ed., São Paulo: Roca, 2006, 240p

HINRICHS K, CHOI YH, LOVE LB, VARNER DD, LOVE CC, WALCKENAER BE. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence**. Biol Reprod** 2005;72: 1142-1150.

Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. Biol Reprod. 1993 Feb;48(2):363-70. doi: 10.1095/biolreprod48.2.363. PMID: 8439626.

JACOBSON, C.C., CHOI, Y.H., HAYDEN, S.S. AND HINRICHS, K. (2010) Recovery ofmare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocystformation after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenol**. 73, 1116-1126

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica. 10º ed**. 2004, Guanabara Koogan.

KAWAMURA K, KUMAGAI J, SUDO S, CHUN SY, PISARSKA M, MORITA H, et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proc Natl Acad Sci.** 2004;101:7323-8.

KAWAMURA, K., CHENG, Y., KAWAMURA, N., TAKAE, S., OKADA, A., KAWAGOE, Y., et al. (2011). Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Hum. Reprod**. 26, 3094–3101. doi: 10.1093/humrep/ der282

KORSHOLM, M. S., et al. (2015). Characterization of cumulus-oocyte complexes and their influence on in vitro fertilization. Reproduction, 149(5), 517-528. https://doi.org/10.1530/REP-14-0553.

LAMPE PD, TENBROEK EM, BURT JM, KURATA WE, JOHNSON RG, LAU AF. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. J **Cell Biol** 2000;149: 1503-1512.

LANDIM-ALVARENGA FC, MAZIERO RRD. Control of oocyte maturation. **Anim Reprod** 2014;11: 150-158.

LARSEN, W. J. et al. Cumulus expansion initiates physical and developmental autonomy of the oocyte. Zygote, Cambridge University Press, 26 set. 2008.

LEWIS, N., HINRICHS, K., SCHNAUFFER, K., MORGANTI, M. AND MCG. ARGO, C.(2016) Effect of oocyte source and transport time on rates of equineoocyte maturation and cleavage after fertilization by ICSI, with a note onthe valiadtion of equine embryo morphological classification. **Clin.Theriogenol**. 8, 25-39.

LIN R. Maternal mRNA and the polyA tail. **Nature Educ**. 2010;3:47.

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L, JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of oocyte mammalian growth and early folicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an ols timer. **Developmental Biology**, v. 299, p. 1-11, 2006.

LODDE V, COLLEONI S, TESSARO I, CORBANI D, LAZZARI G, LUCIANO AM, 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. **Reprod Fertil Dev** 2019;31: 1793-1804.

LONERGAN P, FAIR T. Maturation of oocytes in vitro. Annu Rev **Anim Biosci** 2016;4: 255-268.

LORENZO PL, LIU IKM, CARNEIRO GF, CONLEY AJ, ENDERS AC. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. **Equine Vet** J 2002;34: 378-382.

LOSINNO L, UROSEVIC IM. Equine embryo transfer. Technical and practical considerations for application on horse production programs. In: 19th International Congress on **Biotechnology in Animal Reproduction** (ICBAR). Proceedings... Novi Sad, Serbia, p.23-30, 2015.

LUCIANO AM, GOUDET G, PERAZZOLI F, LAHUEC C, GERARD N. Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in vivo and in vitro matured equine oocytes. **Mol Reprod Dev** 2006;73: 658-666.

MACAULAY AD, GILBERT I, CABALLERO J, BARRETO R, FOURNIER E, TOSSOU P, SIRARD MA, CLARKE HJ, KHANDJIAN EW, RICHARD FJ et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biol Reprod** 2014;91: 90.

MACAULAY AD, GILBERT I, SCANTLAND S, FOURNIER E, ASHKAR F, BASTIEN A, SAADI HA, GAGNE D, SIRARD MA, KHANDJIAN EW et al. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. **Biol Reprod** 2016;94: 16.

MACPHERSON, M.L, & PACCAMONTI, D.L. (2011).Induction ofparturition. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.). **EquineReproduction**. 2nd. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2262-2267

McKINNON, Angus O.; VOSS, James L. Equine Reproduction. **Hardcover**. wiley black well, 1993.

MCNATTY, K. P., et al. (2004). "The Role of Follicular Development and Oocyte Maturation in Reproductive Efficiency in Farm Animals." **Reproduction Fertility and Development**, 16(2), 151-160.

MEINECKE B, JANAS U, PODHAJSKY E, MEINECKE‐TILLMANN S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals** 2001;36: 183-188.

MOLLE S. KINESIO Taping Fundamentals for the Equine Athlete. **Vet Clin North Am Equine** Pract 2016;32: 103-113.

MORRIS LHA. The development of in vitro embryo production in the horse. **Equine Vet J** 2018;50: 712-720.

NOMA N, KAWASHIMA I, FAN HY, FUJITA Y, KAWAI T, TOMODA Y, MIHARA T, RICHARDS JS, SHIMADA M. LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. **Mol Endocrinol** 2011;25: 104-116.

NORRIS RP, FREUDZON M, MEHLMANN LM, COWAN AE, SIMON AM, PAUL DL, LAMPE PD, JAFFE LA. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development** 2008;135: 3229-3238.

OLIVEIRA, N. et al. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal Reproduction Science**, v.190, p.1–9, 2018.

PARK JY, SU YQ, ARIGA M, LAW E, JIN SLC, CONTI M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science** 2004;303: 682-684.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Res** 2001;29: 2002-2007.

PICCIONI, F., ZAPPAVIGNA, V., AND VERROTTI, A. C. (2005). Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly(A) tail relationship. C. R. **Biol**. 328, 863–881. doi: 10.1016/j.crvi.2005.05.006

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. Theriogenology, v. 55, p. 193 – 210, 2001. PRESTES, N.C.; ALVARENGA -LANDIM, F.C**. Obstetrícia Veterinária**. p. 7-18, 2006.

Pincus G., and Enzmann E. V (1935). THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO : I. THE ACTIVATION OF OVARIAN EGGS. J **Exp Med** 62, 665–675. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870440

PINTO MR, MIRAGAYA MH, BURNS P, DOUGLAS, R, NEILD, DM. Strategies for Increasing Reproductive Efficiency in a Commercial Embryo Transfer Program With High Performance Donor Mares Under Training. J **Equine Vet Sci**, v.54, p.93-97, 2017.

PORTO, R. R. M. et al. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inés no acompanhamento do ciclo estral. **Ciência Animal Brasileira,** v. 8, n. 3, p. 521-528, 2007.
RADER, K., CHOI, Y.H. AND HINRICHS, K. (2016) Intracytoplasmic sperminjection, embryo culture, and transfer of in vitro-produced blastocysts.Vet. Clin. N. Am**.: Equine Pract**. 32, 401-413

RAMAKERS C, RUIJTER JM, DEPREZ RHL, MOORMAN AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). **Neurosci Lett** 2003;339: 62-66.

Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. Hum Reprod Update 2017;24: 1-14.

SAMPER JC. Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not. **Theriogenology** 2008;70: 445-447.

SAMPER, J. C. Artificial insemination with fresh and cooled semen. In: SAMPER, J. C. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. 2. ed. Estados Unidos: Elsevier **Health Sciences**, p. 165-174, 2008.

SANDRI LR. Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultra-estrutura de oócitos e sua conseqüência na produção de embriões in vitro [dissertação]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria; 2007.

SEAPA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dados do Rebanho equino Minas Gerais e Brasil. Belo Horizonte, 2019, 33p.

SELA-ABRAMOVICH, Sagit; EDRY, Iris; GALIANI, Dalia; NEVO, Nava; DEKEL, Nava. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2280-2286, 2006. DOI: 10.1210/en.2005-1011.

SHARP, D.C.(1988).Transition into the breeding season: clues to the mechanism of seasonality.**Equine VetJ**.20, 159–1617

SHIMADA M, UMEHARA T, HOSHINO Y. Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation process. **Reprod Med Biol** 2016;15: 201-216.
SHIMADA M, YAMASHITA Y. The Key Signaling Cascades in Granulosa Cells during Follicular Development and Ovulation Process. **Journal of Mammalian Ova Research** 2011;28: 25-31.

SHUHAIBAR LC, EGBERT JR, EDMUND AB, ULIASZ TF, DICKEY DM, YEE SP, POTTER LR, JAFFE LA. Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone. **Dev Biol** 2016;409: 194-201.

SIRARD MA, RICHARD F, BLONDIN P, ROBERT C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. 2006;65:126-36

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The erliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v. 123, p. 185-202, 2002.

SOARES ACS, LODDE V, BARROS RG, PRICE CA, LUCIANO AM, BURATINI J. Steroid hormones interact with natriuretic peptide C to delay nuclear maturation, to maintain oocyte-cumulus communication and to improve the quality of in vitro-produced embryos in cattle. **Reprod Fertil Dev** 2017;29: 2217-2224.

SQUIRES, E. (2020). Current reproductive technologies impacting equine embryo production. **Journal of Equine Veterinary Science**, 89.

SU YQ, DENEGRE JM, WIGGLESWORTH K, PENDOLA FL, O"BRIEN MJ, EPPIG JJ. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte–cumulus cell complex. **Dev Biol.** 2003;263:126-38.

TOMEK W, TORNER H, KANITZ W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reprod Domest Anim**. 2002;37:86-91.

TSAFRIRI A, CHUN SY, ZHANG R, HSUEH AJW, CONTI M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Dev Biol** 1996;178: 393-402.

VACCARI S, WEEKS JL, 2ND, HSIEH M, MENNITI FS, CONTI M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biol Reprod** 2009;81: 595-604.

VAN DEN HURK, R., & ZHAO, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, 63(6), 1717-1751.

WALKER BN, BIASE FH. The blueprint of RNA storages relative to oocyte developmental competence in cattle (Bos taurus). **Biol Reprod,** v.102, n.4, p.784-794, 2020.

WALSER, C. B., AND LIPSHITZ, H. D. (2011). Transcript clearance during the maternalto-zygotic transition. Curr. Opin. **Genet. Dev**. 21, 431–443. doi: 10.1016/j.gde. 2011.03.003

WESSEL GM, BROOKS JM, GREEN E, HALEY S, VORONINA E, WONG J, ZAYDFUDIM V, CONNER S. The biology of Cortical Granules**. Int Rev Cytol**, v.209,p.117-206, 2001.

YAMADA M, ISAJI Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reprod Med Biol**. 2011;10:69-79.

ZHANG M, SU YQ, SUGIURA K, WIGGLESWORTH K, XIA G, EPPIG JJ. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology** 2011;152: 4377-4385.

ZHANG M, SU YQ, SUGIURA K, XIA G, EPPIG JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science** 2010;330: 366-369.