



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

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS EQUINOS

MARIANA SILVA FRASSON

Botucatu, São Paulo
Maio/2023

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

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS EQUINOS

MARIANA SILVA FRASSON

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Unesp, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu, São Paulo
Maio/2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Frasson, Mariana Silva.

Maturação *in vitro* de oócitos equinos / Mariana Silva
Frasson. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Fertilização *in vitro*. 2. Fase de Clivagem do Zigoto.
3. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 4. Oócitos. 5.
Embriologia veterinária. 6. Reprodução animal.

Palavras-chave: Aspiração folicular; Clivagem; Meio de
maturação; Oócitos; Produção de embriões.

Nome do autor (a): Mariana Silva Frasson

Data da Defesa da Dissertação: 26 de maio de 2023.

Título: Maturação *in vitro* de oócitos equinos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ – UNESP –
Botucatu/SP

Prof. Dr. Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ – UNESP –
Botucatu/SP

Dr. Ana Carolina Silva Soares

Membro

Médica Veterinária Autônoma

*Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz. Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão; Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé; Onde houver erro, que eu leve a verdade; Onde
houver desespero, que eu leve a esperança; Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
onde houver trevas, que eu leve a luz.*

São Francisco de Assis



DEDICATÓRIA

Aos meus pais Evandro e Cláudia, minha irmã Marina e ao meu namorado Lucas, pelo exemplo de humildade, por todo amor, carinho, incentivo, ensinamentos e apoio passados durante esses anos todos.

Aos meus avós Sr. Tito (in memoriam), Dona. Lina, Dona. Dirce, Sr. Elizeu, que são meu alicerce e percorssores de mais este sonho em minha vida que se realiza.

*Aos inteligentes, sensíveis e maravilhosos cavalos.
Está conquista dedico a todos vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por sempre iluminar e direcionar o meu caminho, por me dar força, foco e sabedoria para poder superar os obstáculos dessa jornada.

Aos meus pais queridos, Evandro e Cláudia, que são meu exemplo e sempre me aconselhando da melhor forma, sem o apoio deles nada disso seria possível. A minha querida e companheira irmã Marina que mesmo de longe sempre me motivou a continuar seguindo meu sonho.

Ao meu namorado Lucas Troncarelli pelo intenso apoio, pela ajuda preciosa nesse trabalho, pelos bons conselhos e por nunca ter duvidado da minha capacidade.

Aos meus sogros Regina e Miguel, que me acolheram como uma filha em sua família, a minha querida cunhada Isabella que é como uma irmã para mim.

Ao meu orientador Professor Doutor Frederico Ozanam Papa, pela amizade, por confiar em mim e no meu trabalho, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, estando sempre disposto em me auxiliar. Muito obrigado, sempre terá minha sincera admiração e respeito.

Aos demais professores do Departamento de Reprodução Animal, o meu agradecimento e respeito pela contribuição, aprendizado e experiência concedida.

Ao José Dell'Aqua, Márcio Teoro, Prof. Fernanda Saules e Camila Dell'Aqua por todo incentivo, amizade e ensinamentos!

A Raquel Puelker e Heloisa Canesin por todo carinho, ensinamentos e intensa disponibilidade e colaboração para ajudar na execução e contribuição deste trabalho. Vocês são incríveis e fazem parte dessa conquista.

Aos meus colegas e amigos Thaís Cavaleiro, Sidnei Nunes, Luiz Roberto Junior, Lorenzo Segabinazzi, Lucas Canuto, Mariana Gobato, Rafael Bandeira, Camila Trinque, Raiza Rocha, Giovana Camargo, Luan Sitó, Beatriz Lippe, Estevam Rodrigues pela amizade que construímos.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução: Edivaldo, Felipe, Edilson e Evandro.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu/SP pelas oportunidades oferecidas e pelo meu crescimento profissional.

À Botupharma, pela contribuição e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Claudio Haga, pela disponibilidade em ajudar e por ter aberto as portas do Laboratório de Embriologia da Central de Reprodução CH Reprodução Equina.

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

LISTA DE ABREVEATURAS

ART's: Tecnologias de reprodução assistida
PIV: Produção in vitro
OPU: Ovum Pick Up/ Aspiração folicular
MIV: Maturação in vitro
ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
FIV: Fertilização in vitro
CIV: Cultivo in vitro
COCs: Complexo cumulus oócitos
ZP: Zona pelúcida
VG: Vesícula germinativa
M I: Metáfase I
M II: Metáfase II
SFB: Soro fetal bovino
GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG: Gonadotrofina coriônica humana
FSH: Hormônio folículo estimulante
LH: Hormônio luteinizante
IGF - I: Fator de crescimento semelhante a Insulina I
EGF: Fator de crescimento epidermal
ITS: Insulina, transferrina, sodium selenite
TCM 199: Tissue culture medium 199
DMEM/F12: Dulbecco's modified eagle medium - F12
mmol/L: milimol/L
Mm: milimolar
mL: mililitro
μL: microlitro
μg: micrograma
U.I: Unidades internacionais
°C: graus Celsius
O2: Oxigênio
CO2: Gás carbônico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de oócitos degenerados, vesículas germinativas, MI e MII após maturação com dois diferentes meios.....	47
Tabela 2 - Número de células e taxa de clivagem por oócitos injetados para diferentes meios de maturação no dia 3 após ICSI.....	47
Tabela 3 - Número de células e taxa de clivagem por oócitos aspirados para diferentes meios de maturação no dia 3 após ICSI	48
Tabela 4 - Taxa de blastocisto por oócitos injetados para diferentes meios de maturação	48
Tabela 5 - Taxa de blastocisto por oócitos aspirados para diferentes meios de maturação	48

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	14
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ASPECTO ANATÔMICO E FUNCIONAL DO OVÁRIO	16
2.2 GAMETOGENESE, OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	17
2.3 FERTILIZAÇÃO	20
2.4 CLIVAGEM DO ZIGOTO E FORMAÇÃO DO BLASTOCISTO	22
2.5 OBTENÇÃO DE OÓCITOS.....	24
2.5.1 Recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios	24
2.5.2 Recuperação de oócitos de folículos imaturos	25
2.5.3 Recuperação de oócitos de ovários excisados post mortem	26
2.6. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	27
2.7. INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE (ICSI).....	28
2.8. CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV).....	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
REFERÊNCIAS	31
HIPÓTESE.....	37
OBJETIVOS.....	37
CAPÍTULO 2.....	38
ARTIGO 1: NOVA COMPOSIÇÃO DE MEIO DE MATURAÇÃO PARA A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES EQUINOS	

FRASSON, M.S. MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS EQUINOS. Botucatu-SP.2023.55p. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões equinos pelo método de OPU-ICSI, vem crescendo constantemente devido as melhorias significativas em sua técnica laboratorial e consequentemente melhores resultados na produção de embriões e taxas de prenhez. Desta forma houve um aumento na procura e demanda devido ao interesse entre os criadores de cavalos, para quem esta biotecnologia proporciona diversos recursos na reprodução equina, como a otimização no uso do sêmen congelado, permanência de reprodutoras idosas que já impossibilitam sua fertilidade pelas técnicas convencionais e o uso de éguas com distúrbios do trato reprodutivo. No entanto, a maturação *in vitro* é um ponto crucial para o sucesso na produção *in vitro* de embriões. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dois tipos específicos de meios para a maturação *in vitro* de oócitos imaturos, analisando a competência de desenvolvimento dos oócitos para a realização da fertilização (ICSI). Foram realizadas cinco sessões de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom, utilizando quatro (n=4) éguas por sessão. Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram coletados e distribuídos aleatoriamente em dois grupos diferentes. O meio de maturação do grupo controle (GC) foi composto de DMEM/F-12, suplementados com FSH, LH, aditivos (ITS, EGF, IGF, piruvato) e 15% de SFB, já o meio de maturação do grupo experimental (GE) foi constituído de TCM199 com sais de Earle, FSH, 17 β -estradiol, aditivos (ITS, EGF, IGF, piruvato) e 10% de SFB. Posteriormente, os COCs foram mantidos em meio de manutenção durante o período de 5-12 horas de espera, em seguida transferidos para meio de maturação e cultivados por 36 horas em incubadora de 5% CO₂ ao ar, em temperatura 38,2°C. Logo após, os COCs foram então desnudados, para a visualização da extrusão do corpúsculo polar, realização da ICSI e os possíveis zigotos foram cultivados em incubadora de 5%CO₂, 6%O₂ à 38,2°C. A clivagem foi verificada no dia 3 após a ICSI, os blastocistos foram avaliados e classificados (em uma escala de grau A-B-C) dos dias 7 a 10. Os resultados demonstraram que não houve diferença (P > 0,05) entre os grupos em degenerado (GC=15,7%, 13/83; GE= 9,5%, 8/84), estágio VG (GC=4,8%, 4/83; GE=6,0%, 5/84), presuntivos MI (GC=4,8%, 4/83; GE=2,4%, 2/84) ou MII (GC=74,7%, 62/83; GE= 81,0%, 68/84) dos oócitos avaliados após cultura de maturação. Em relação a taxa de clivagem no dia 3 não houve diferença (P > 0,05) entre os grupos (GC=72,2%, 39/54; GE= 67,9%, 38/56). Na contagem de células, o grupo controle apresentou diferença estatística, tendo maior número de embriões em estágio de 2 células no dia 3 (GC=13,0%, 7/54; GE=1,8%, 1/56). No entanto, o grupo experimental mostrou tendência (P = 0,07) de ter mais embriões no estágio de 8-16 células no dia 3 (GC=5,6%, 3/54; GE=17,9%, 10/56). Não houve diferenças significativas na taxa de blastocisto entre os grupos (GC=21,0%, 13/62; GE=23,5%, 16/68). Para a classificação dos embriões, não houve diferença (P > 0,05) entre os grupos, nos três diferentes graus (9,7%, 6/62 e 13,2%, 9/68 para o grau A; 6,5%, 4/62 e 10,3%, 7 /68 para o grau B; e 4,8%, 3/62 e 0,0%, 0/68 para o grau C, os valores apresentados são do grupo controle e experimental, respectivamente). Embora

não houve diferença estatística na maioria das variáveis, podemos observar que o grupo experimental mostrou numericamente mais oócitos no estágio MII, menos embriões no estágio de 2 células e mais embriões no estágio de 8-16 células no dia 3. Da mesma forma, podemos observar numericamente mais embriões de alta qualidade (grau A e B) no grupo experimental do que no grupo controle. Ainda assim, com um número total maior de oócitos, provavelmente encontraríamos diferenças estatísticas nessas variáveis. Por este motivo estudos adicionais são necessários para aprimorar a eficiência deste meio de maturação.

Palavras-chave: Oócitos, Aspiração folicular, Meio de maturação, Clivagem, Cultivo in vitro, Produção de embriões.

FRASSON, M.S. MATURATION IN VITRO OF EQUINE OOCYTES. Botucatu-SP, Brazil. 2023.55p. São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu.

ABSTRACT

The in vitro production of equine embryos by the OPU-ICSI method has been constantly growing due to significant improvements in its laboratory technique and consequently better results in embryo production and pregnancy rates. In this way, there has been a greater demand and demand due to the interest among horse breeders, where with this biotechnology it provides them with several resources in equine reproduction, such as the optimization in the use of frozen semen, the permanence of elderly breeders that already make their fertility impossible due to conventional techniques and mares with reproductive tract disorders. However, in vitro maturation is a crucial point for successful in vitro embryo production. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of two specific types of maturation media, performing in vitro maturation of immature oocytes to analyze the developmental competence of in vitro matured oocytes. Five sessions of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration were performed, using four (n=4) mares per session. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected and randomly distributed into two different groups. The maturation medium of the control group (GC) was composed of DMEM/F-12 with 0.1 IU/mL of FSH, 0.1 IU/mL of LH, additives (ITS, EGF, IGF, pyruvate) and 15% of FBS, whereas the maturation medium of the experimental group (EG) consisted of TCM199 with Earle's salts, 0.1 UI/mL of FSH, 17 β -estradiol, additives (ITS, EGF, IGF, pyruvate) and 10% of FBS. Subsequently, the COCS were kept in maintenance medium during the waiting period of 5-12 hours, then transferred to maturation medium and cultivated for 36 hours in an incubator with 5% CO₂ in air, at a temperature of 38.2°C. Soon after, the COCs were then stripped, visualization of the extrusion of the polar body, ICSI was performed and the presumptive zygotes were cultured in a 5%CO₂, 6%O₂ incubator at 38.2°C. Cleavage was checked and cells counted on day 3 after ICSI, blastocysts were evaluated and graded (on an A-B-C grade scale) from days 7 to 10. Results demonstrated that there was no difference ($P > 0.05$) between the groups in degenerate (GC=15.7%, 13/83; EG= 9.5%, 8/84), VG stage (GC=4.8%, 4/83; EG=6.0%, 5 /84), MI presumptives (GC=4.8%, 4/83; GE=2.4%, 2/84) or MII (GC=74.7%, 62/83; GE=81.0%, 68/84) of the oocytes evaluated after maturation culture. Regarding the cleavage rate on day 3, there was no difference ($P > 0.05$) between groups (GC=72.2%, 39/54; EG= 67.9%, 38/56). In the cell count, the control group showed a statistical difference, having a greater number of embryos at the 2-cell stage on day 3 (GC=13.0%, 7/54; EG=1.8%, 1/56). However, the experimental group tended ($P = 0.07$) to have more embryos at the 8-16 cell stage on day 3 (GC=5.6%, 3/54; EG=17.9%, 10/ 56). There were no significant differences in blastocyst rate between groups (GC=21.0%, 13/62; EG=23.5%, 16/68). For the classification of the embryos, there was no difference ($P > 0.05$) between the groups, in the three different grades (9.7%, 6/62 and 13.2%, 9/68 for grade A; 6.5 %, 4/62 and 10.3%, 7/68 for grade B; and 4.8%, 3/62 and 0.0%, 0/68 for grade C, the values shown are for the control group and experimental, respectively). Although there was no statistical difference in most variables, we can observe that the experimental group was superior to the control group. The

experimental group numerically showed more oocytes at the MII stage, fewer embryos at the 2-cell stage and more embryos at the 8-16 cell stage on day 3. Likewise, we can numerically observe more high quality embryos (grade A and B) in the experimental group than in the control group. Still, with a larger total number of oocytes, we would likely find statistical differences in these variables. For this reason, additional studies are needed to improve the efficiency of this maturation medium.

Keywords: Oocytes, Follicular aspiration, Maturation medium, Cleavage, In vitro culture, Embryo production.



CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A utilização das tecnologias de reprodução assistida (ART's) em equinos vem apresentando um grande avanço de forma exponencial por todo o mundo, sendo a inseminação artificial e a transferência de embriões produzidos *in vivo* as técnicas mais realizadas atualmente. No entanto, houve um crescimento na utilização da produção *in vitro* (PIV) de embriões, principalmente nas biotecnologias de ICSI e clonagem (ALVARENGA e LANDIM- ALVARENGA, 2009).

Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) em 2020 houve um aumento na produção de embriões equinos, produzidos *in vivo* e *in vitro*. O notável aumento no número de embriões produzidos *in vitro* foi impulsionado pelos países Itália, Brasil, EUA, onde o Brasil lidera a produção *in vivo* mundial e a Itália *in vitro* (VIANA,2021).

Na espécie equina, diferentemente de outras espécies, há alguns obstáculos na produção *in vitro* de embriões principalmente em relação a fisiologia e a anatomia do oócito da égua (GERANDI e ROBIN, 2019). Rotineiramente, utilizando-se o procedimento de aspiração folicular, são aspirados oócitos imaturos, que estão no estágio de prófase I da meiose I, (METCALF et al., 2020), sendo necessário a realização da etapa de maturação *in vitro* oocitária. Os oócitos equinos possuem grande quantidade de gotículas lipídicas (VOGELSANG et al., 1987) e fortes junções comunicantes que mantêm as células do complexo cumulus-oócito (COC) intensamente ligadas à parede folicular (GOUDET et al., 1997; METCALF et al., 2020), dificultando o processo de aspiração folicular.

Além disso na égua, a estimulação hormonal exógena para superovulação apresenta resultados insatisfatórios, comparados com outras espécies. Na espécie equina, fisiologicamente, há apenas um ou dois folículos pré ovulatórios disponíveis por ciclo estral para aspiração folicular e recuperação de oócitos maduros. (METCALF et al., 2020).

Em relação à FIV convencional, técnica utilizada em bovinos, apenas recentemente em um estudo desenvolvido obteve sucesso no uso da FIV com sêmen a fresco de equinos, devido principalmente à dificuldade de estimular a

capacitação espermática *in vitro* (Felix, et al., 2022) e o endurecimento da zona pelúcida durante o processo de maturação do oócito. Com isso, a ICSI se tornou a técnica de escolha para a produção *in vitro* de embriões equinos, principalmente no mercado brasileiro onde utiliza-se em sua maioria sêmen criopreservado importado.

Neste contexto, a maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa importante e um fator limitante para a produção *in vitro* de embriões equinos. Sendo assim, grande é o interesse em aprimorar a produção *in vitro* de embriões como uma ferramenta para contornar os problemas reprodutivos das éguas e otimizar o uso de sêmen congelado de baixa qualidade ou sêmen de garanhões que já morreram. Com base nisso, o presente estudo tem como objetivo a avaliação da utilização de uma nova estratégia de meio de maturação *in vitro* de oócitos equinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTO ANATÔMICO E FUNCIONAL DO OVÁRIO

O sistema reprodutivo da égua é composto pela genitália externa (vulva, clitóris, vestíbulo vaginal) e genitália interna (vagina, cérvix, útero, tuba uterina e ovários), podendo também ser subdividido em dois grupos de órgãos: estruturas que são intrínsecas ao trato reprodutivo e de estruturas que são isoladas ao trato reprodutivo como a retina, glândula pineal, hipotálamo e hipófise, mas que desempenham um papel essencial para o funcionamento e regulação dos eventos reprodutivos (HAFEZ; HAFEZ,2004; BRISKO et al.,2011).

O trato reprodutivo está localizado na cavidade pélvica, os órgãos genitais internos são sustentados pelo ligamento largo que consiste em: mesovário que sustenta o ovário, mesossalpinge a tuba uterina e o mesométrio o útero (HAFEZ; HAFEZ,2004).

Os ovários estão localizados na área sublombar (ventral a quarta e quinta vertebrae lombares), suspensos pelo ligamento largo e geralmente localizados caudais ao rim, esta localização dos ovários pode variar em alguns momentos, devido à extensão do ligamento mesóvario que permite a sua movimentação. O seu tamanho pode variar de acordo com a atividade ovariana, sendo maior durante a fase reprodutiva de ciclicidade, já seu formato (denominado forma de

feijão) é devido sua particularidade anatômica pela presença da fossa da ovulação (BRISKO et al.,2011; GINTHER, 1992).

Os ovários na espécie equina exigem uma avaliação específica comparado com outras espécies, já que suas particularidades morfológicas influenciam na fisiologia. (EVANS et al.,2007).

Na maioria dos animais domésticos a parte medular do ovário encontra-se na região central e é circundada pelo córtex. No entanto, nos equinos podemos referenciar que o ovário é “de dentro para fora”, ou seja, a zona medular (tecidos conectivos, musculares e grande quantidade de vasos sanguíneos) é superficial e a zona cortical (formação e desenvolvimento dos folículos) está no interior da glândula. O tecido cortical atinge a superfície ovariana apenas em uma depressão da borda ventral do ovário, sendo, portanto, a única área por onde ocorre a ovulação; região denominada fossa da ovulação (EVANS et al.,2007). Os ovários desempenham duas funções importantes, a exócrina (produção e liberação de oócitos) e endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides – estrógeno e progesterona) (HAFEZ; HAFEZ,2004).

A produção do gameta feminino (oócito) é decorrente da interação de dois eventos que ocorre no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1981).

2.2 GAMETOGENESE, OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

A gametogênese é o processo de formação e desenvolvimento dos gametas masculino (espermatozoide) e feminino (oócito), denominados respectivamente, espermatogênese e oogênese. Cada gameta formado carrega seu material genético e a fusão deles dará origem ao zigoto e início do desenvolvimento embrionário.

A oogênese ocorre durante a vida fetal, as células germinativas primordiais (oogônias), precursoras dos oócitos, iniciam a sua multiplicação através de divisões mitóticas evento que ocorre no córtex ovariano durante a fase inicial do desenvolvimento fetal. Posteriormente as oogônias inicia o primeiro processo de divisão meiótica formando os oócitos primários, que permanece em fase de prófase I da meiose I ou vesícula germinativa, até que a fêmea atinja a puberdade (BLOOM; FAWCETT, 1994).

Quando a puberdade é atingida, um pouco antes da ovulação os oócitos primários completam a primeira divisão meiótica, o núcleo do oócito perde seu envoltório nuclear, os cromossomos condensam migrando para a periferia da célula, entrando em metáfase I. Neste momento ocorre a citocinese desigual (divisão das células filhas de forma não iguais) dando origem ao oócito secundário (que retém quase todo citoplasma) e ao primeiro corpúsculo polar (que contém pequeno núcleo e quantidade mínima de citoplasma) que é extrusado dentro do espaço perivitelino. Posteriormente ocorre a absorção do primeiro corpúsculo polar I e o núcleo do oócito secundário retoma a segunda divisão meiótica, que estaciona em metáfase II até que haja a fertilização por um espermatozoide, e, se for fecundado, volta a dividir-se (meiose II) formando o segundo corpúsculo polar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A unidade funcional do ovário, é o folículo. O folículo ovariano é uma estrutura extremamente organizada constituída pelo oócito circundado por células foliculares e limitado por uma membrana basal que o separa do estroma ovariano. A principal função do folículo é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito, bem como produzir hormônios esteroides (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que se inicia com o desenvolvimento das oogônias e a formação do folículo primordial, e que termina com a formação do folículo de Graaf, também chamado de folículo antral, ou pré-ovulatório (PICTON, 2001).

A partir da puberdade, os folículos primordiais iniciam o processo de crescimento, que compreende as modificações que ocorrem no oócito, nas células foliculares e no estroma ovariano (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No folículo primordial acontece a proliferação das células da granulosa, que possui camada de células achatadas e são transformadas em células cuboides, ocorrendo a passagem de estágio de folículo primordial para folículo primário (HIRSHFIELD, 1992).

O folículo primário é caracterizado pelo aumento do tamanho do oócito, posicionado na região central do folículo, circundado por uma camada de células da granulosa com formato cuboide e apresentam uma zona pelúcida em formação (HYTTEL ET AL., 1997). As células da granulosa se comunicam por junções comunicantes (gap) e a principal função dessas junções é permitir a

passagem de substâncias de baixo peso molecular das células do cumulus para os oócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os folículos secundários apresentam o oócito inteiramente circundado pela zona pelúcida, possui duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006) e diferenciação das células da teca, que são formadas em seguimentos paralelos das fibras de tecido conjuntivo (HIRSHFIELD, 1991).

Os folículos terciários também denominados de folículos antrais, de Graaf ou pré - ovulatórios, nessa fase do desenvolvimento folicular apresentam a formação de uma cavidade, denominada de antro, que é preenchida por um fluido, o líquido folicular (BLOOM; FAWCETT, 1994). Com o aumento do antro o oócito fica ligeiramente afastado do centro, ocorre a reorganização das células da granulosa por conta da formação do antro, algumas dessas células se concentram em um determinado local da parede do folículo formando um pequeno espessamento o cumulus oophorus, que serve de apoio para o oócito e o mantém projetado no interior do folículo. Além disso, um pequeno grupo de células foliculares envolve o oócito constituindo a corona radiata. Os folículos antrais também apresentam uma membrana basal e duas camadas de células tecais que são divididas em interna e externa e ficam situadas ao redor das células da granulosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Durante cada ciclo estral, um folículo apresenta um crescimento maior que os outros e se torna o folículo dominante (de Graaf), o qual alcança um ponto máximo de crescimento e desenvolvimento tornando – se apto a ovular. Os demais folículos que estavam também em crescimento entram em atresia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O processo de maturação oocitária se divide em dois estágios; a primeira é conhecida como fase de crescimento oocitário, quando o folículo primordial e seu oócito iniciam seu crescimento e a atividade das células internas do cumulus contribui de forma ativa para o processo de crescimento do oócito, no qual o seu crescimento está quase completo quando ocorre a formação do antro ((HAFEZ; HAFEZ, 2004). Durante esta fase também ocorre a regulação da síntese de proteínas e a formação de organelas, tais como: mitocôndrias, ribossomos, grânulos corticais e vesículas contendo fontes energéticas; diferenciando a célula germinativa feminina em um gameta funcional (PAYNTON; BACHVAROVA, 1990).

Ao longo deste período acontece a formação de uma membrana glicoproteica, denominada zona pelúcida (ZP), que forma um revestimento protetor ao redor do oócito, o qual consiste de 3 glicoproteínas, ZP1, ZP2 e ZP3 (SOYAL, et al., 2000).

A segunda fase denominada de maturação final, envolve as modificações nucleares e citoplasmática do oócito (SATHANANTHAN, 1994). Essa etapa é caracterizada pelo reinício da primeira divisão meiótica, quando o núcleo do oócito deixa a fase de vesícula germinativa e entra em metáfase I, que ocorre após a puberdade dentro do folículo pré-ovulatório (GORDON, 1994).

Todo o processo de oogênese, crescimento folicular e maturação oocitária depende de secreção adequada e concentrações suficientemente elevadas de hormônios (Hafez; Hafez, 2004). O GnRH liberado pelo hipotálamo, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, atinge a hipófise e estimula a secreção das gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). Por via circulação sistêmica esses hormônios chegam aos ovários. O FSH é responsável por estimular o crescimento e desenvolvimento folicular, enquanto o LH terá a função de maturação folicular e oocitária final, posterior ovulação do folículo dominante e luteinização (BRISKO et al., 2011). Na égua não existe um pico pré-ovulatório de LH precedendo a ovulação; em lugar disso, as concentrações de LH aumentam gradativamente durante o estro, que culmina no afinamento e ruptura da parede do folículo e expulsão do oócito, evento este conhecido por ovulação. (HINRICHS et al., 1993). As células presentes no folículo ovulado sofrem uma transformação chamada luteinização, formando o corpo lúteo, que produz progesterona (BRISKO et al., 2011).

2.3 FERTILIZAÇÃO

A fertilização é o processo pelo qual duas células haploides, o gameta masculino e feminino se funde na região da ampola da tuba uterina para originar o ovo, ou zigoto (HYTTEL et al., 2012; BLOOM; FAWCETT, 1994).

Para ocorrer a fecundação e a fusão dos gametas, os espermatozoides passam por algumas modificações, que inclui a capacitação espermática e a reação acrossomal (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Os espermatozoides não estão aptos a fertilizar o oócito imediatamente após a sua chegada no trato reprodutivo genital da fêmea, para adquirir habilidade de fecundar o oócito, passa pelo

processo denominado capacitação espermática que ocorre na região do istmo na tuba uterina. A capacitação espermática inclui modificações que ocorrem na membrana plasmática do espermatozoide, remoção da cobertura glicoproteica e das proteínas do plasma seminal da superfície do espermatozoide, alterações na motilidade do flagelo e modificações no acrossomo para a penetração espermática na membrana plasmática do oócito (HYTTEL et al., 2012).

Logo após a capacitação espermática, ocorre a ligação do espermatozoide capacitado à zona pelúcida (ZP) do oócito. O contato com a ZP induz a reação acrossomal do espermatozoide, que sucede a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossomo, em seguida a liberação de enzimas hidrolíticas (acrosina/hialuronidase) pelo acrossomo vai proporcionar a digestão enzimática das glicoproteínas da ZP e a propulsão vigorosa da cauda do espermatozoide permite a penetração da matriz da ZP. Subsequentemente após o espermatozoide atingir o espaço perivitelínico, a membrana do segmento equatorial do espermatozoide adere e funde-se com a membrana do oócito, evento este chamado de singamia (HYTTEL et al., 2012; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Imediatamente após a fusão do gameta masculino e feminino, o oócito sofre a ativação oocitária, que vai estabelecer o bloqueio à poliespermia, a 2ª retomada da meiose e o início do desenvolvimento embrionário (HYTTEL et al., 2012).

A ativação oocitária é baseada na interação entre as membranas plasmática do oócito e do espermatozoide, na introdução de um fator espermático no interior do citoplasma do oócito, aumento na concentração de íons de cálcio que será essencial para ativação do desenvolvimento embrionário e também o aumento do pH intracelular que ativa a síntese proteica (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Por outro lado, o bloqueio rápido à poliespermia é mediado pela despolarização elétrica da membrana do oócito, já o bloqueio lento é estabelecido pela reação cortical, onde através de uma onda de exocitose os grânulos corticais do oócito que se fundem a sua própria membrana plasmática liberando as enzimas contidas nos grânulos corticais para o espaço perivitelínico. A liberação dessas enzimas vai modificar as moléculas da zona pelúcida que se liga aos espermatozoides, desta maneira vai ocorrer o

endurecimento da zona pelúcida ocasionando o bloqueio da penetração dos espermatozoides (HYTTEL et al., 2012; PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Como outra consequência da ativação oócitária a meiose é retomada e desencadeia a conclusão da segunda divisão celular meiótica do oócito. A célula filha que quase não recebe citoplasma é chamado de segundo corpúsculo polar e a outra célula filha é oócito definitivo, agora referido como zigoto. Quando o núcleo do espermatozoide é englobado pelo citoplasma do oócito ocorre uma série de mudanças de forma sequencial. As mudanças na estrutura nuclear incluem a formação dos pronúcleos masculino e feminino, migração e aproximação desses pronúcleos para o centro do zigoto, perda dos seus envelopes nucleares e mistura dos genomas materno e paterno, evento chamado de cariogamia (HYTTEL et al., 2012). Finalmente, haverá o início de uma divisão mitótica e do desenvolvimento embrionário (YANAGIMACHI, 1994).

2.4 CLIVAGEM DO ZIGOTO E FORMAÇÃO DO BLASTOCISTO

A dissolução dos pronúcleos masculino e feminino e mistura dos seus cromossomos irá conceder a formação do zigoto. O citoplasma do zigoto, herdado do oócito, contém a composição molecular e estrutural necessária para iniciar a clivagem (HYTTEL et al., 2012).

A clivagem consiste no processo de repetidas divisões mitóticas do zigoto, resultando num rápido aumento no número de células, denominadas blastômeros. Durante a clivagem o zigoto encontra-se envolto pela zona pelúcida (MOORE et al., 2016).

Após a quarta divisão celular (estágio de 8- 16 células), os blastômeros sofrem uma mudança em seu comportamento, se aglomeram firmemente uns com os outros, aumentando o contato entre si, formando uma massa compacta de células, processo esse conhecido como compactação. Esse amontoamento dos blastômeros é estabilizado por junções do tipo oclusiva que se formam entre as células externas, entretanto as células internas formam junções comunicantes, permitindo o transporte de pequenas molécula e íons entre elas (MOORE et al., 2016, PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006)

Na espécie equina a primeira clivagem ocorre aproximadamente 24 horas após a fecundação e o processo de compactação se inicia no estágio de 8-16

células. Quando os blastômeros compactados do embrião se dividem no estágio de 16-32 células é chamado de mórula, constituída de pequeno grupo de células internas rodeadas por um grupo maior de células externas (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006; GINTHER, 1992)

As células externas da mórula vão se diferenciar em células do trofoblasto, no qual originará o cório, a porção embrionária da placenta. O cório é o tecido que permite ao feto obter oxigênio e alimento a partir da mãe. Estas células do trofoblasto são necessárias para a implantação do embrião na parede uterina (GINTHER, 1992). Ainda assim, os blastômeros internos da mórula no estágio de 32 células se dividem em 64 células formando a massa celular interna, dando origem ao botão embrionário (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Inicialmente, a mórula não tem uma cavidade interna, entretanto, durante um processo chamado de cavitação, as células do trofoblasto secretam um fluido para o interior da mórula, ocupando um espaço central formando a blastocèle. Desta forma, o botão embrionário posiciona-se de um lado do anel das células trofoblásticas e do outro a blastocèle, formando a estrutura característica do processo da clivagem, o blastocisto. A principal característica da fase de blastocisto é a diferenciação em trofoblasto e botão embrionário (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Nas éguas, a chegada do embrião ao útero ocorre ao redor do 6º dia após a fecundação, no estágio de mórula ou blastocisto inicial. Uma particularidade dos embriões equinos é que somente o embrião viável é transportado para o útero através da liberação da prostaglandina E_2 pelo embrião, a qual irá proporcionar contrações locais e relaxamento da musculatura lisa da parede da tuba uterina, permitindo assim que o embrião se mova progressivamente, atravessando a junção útero-tubária, entrando no útero (ALLEN, 2000).

O estágio de blastocisto, logo após a entrada do embrião no útero, caracteriza-se também pela formação de uma cápsula acelular entre a zona pelúcida e as células do trofoblasto. Durante alguns dias, a cápsula permanece recoberta pela zona pelúcida, que vai se adelgaçando gradativamente até acontecer a eclosão do embrião, porém mesmo depois da eliminação da zona pelúcida o embrião fica envolto pela cápsula acelular até aproximadamente o 20º dia de gestação, quando, então, esta se fragmenta devido a ação de enzimas

proteolíticas secretadas pelas células trofoblásticas ou pelo endométrio uterino (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

2.5 OBTENÇÃO DE OÓCITOS

Para a obtenção dos oócitos de éguas vivas é realizada a técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal (BRINSKO et al 2011; McKINNON et al, 2011), existem duas principais abordagens para a coleta dos oócitos: recuperação do oócito em maturação através da aspiração do folículo dominante (pré - ovulatório), após a administração de hCG (gonadotrofina coriônica humana) ou um análogo de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina); ou a recuperação dos oócitos imaturos de todos folículos presente no ovário, que devem ser maturados *in vitro* (HINRICHS, 2018). Ainda assim, é possível recuperar oócitos de ovários excisados de éguas post mortem, a partir da raspagem e lavagem vigorosa dos folículos.

2.5.1 Recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios

Para a realização da aspiração do folículo dominante (pré-ovulatório), é necessário o monitoramento do ciclo estral da égua, acompanhando o crescimento folicular. No momento que apresenta um ou eventualmente dois folículos dominantes com diâmetro de $\pm 35\text{mm}$, e edema endometrial grau 3, é feito a administração de hCG ou um análogo de GnRH para ocorrer a maturação oocitária (CARNEVALE, 2016). A aspiração folicular é realizada 24 horas após a utilização do hormônio indutor da ovulação, para permitir a expansão das células do cumulus e não mais que 35 horas, para que a ovulação não ocorra antes da aspiração (HINRICHS, 2012).

O oócito recuperado através da aspiração folicular é incubado até o momento previsto em que a égua doadora teria ovulado se o folículo não tivesse sido aspirado. Assim, se um oócito é coletado 24 horas após a estimulação com gonadotrofina, ele é incubado em meio de manutenção de 12- 18 h antes da manipulação; se for coletado 35 horas após a indução hormonal, pode ser incubado em meio de manutenção de 1-7 horas antes da manipulação (HINRICHS, 2012). Em seguida, é feito a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) entre 36 - 42 horas após a aspiração folicular. (CARNEVALE, 2016; HINRICHS, 2018).

A recuperação de oócitos maturados *in vivo* a partir da aspiração do folículo pré-ovulatório é mais fácil, devido ao tamanho do folículo e a alta taxa de recuperação oocitária entre 65-80% (HINRICHS, 2012; BRINSKO et al., 2011). No entanto, o número de folículos pré-ovulatórios aspirado é baixo, o uso de hormônios sintéticos que estimulem o crescimento de múltiplos folículos não é uma realidade, pois ainda não há gonadotrofinas comercialmente disponíveis capazes de estimular de forma viável e segura o desenvolvimento de múltiplos folículos pré-ovulatórios na égua, o que significa que apenas 1 ou 2 folículos pré-ovulatórios em desenvolvimento fisiológico por ciclo estariam disponíveis para recuperação de oócitos maduros (STOUT, 2020).

Contudo, a manipulação dos oócitos e manuseio dos equipamentos deve ser realizado com cuidado e próximo a temperatura fisiológica da égua, pois os oócitos já iniciaram seu processo de maturação e são extremamente sensíveis a oscilações de temperatura. Por esta razão, caso o transporte dos oócitos se faça necessário, requer o armazenamento em uma incubadora portátil para o bom desempenho da técnica (HINRICHS, 2012).

2.5.2 Recuperação de oócitos de folículos imaturos

A aspiração dos folículos imaturos é uma técnica bem utilizada para a produção *in vitro* de embriões equinos. Na década de 90, as taxas de recuperação eram muito baixas, em torno de $\leq 25\%$ (HINRICHS, 2012). No entanto, com o aprimoramento da técnica esse cenário mudou, apresentando uma taxa média de recuperação oocitária de 50% a 70% (SANSINEMA, 2020).

O procedimento da aspiração folicular de oócitos imaturos é mais difícil, pois apresentam folículos menores e as células do cumulus compactadas estão fortemente ligadas a parede do folículo, sendo necessário a raspagem vigorosa da parede do folículo, utilizando uma agulha grande em bisel (calibre 12), geralmente de duplo lúmen (lúmen interno para aspiração, externo para lavagem) e a lavagem repetida do lúmen (5 a 10 vezes) para se obter uma melhor taxa de recuperação de oócitos (GALLI et al., 2014; HINRICHS, 2018).

Com esta técnica, todos os folículos presentes no ovário com diâmetro entre 5-10 mm podem ser aspirados no intervalo de 10 -14 dias (CARNEVALE, 2016). Alguns fatores influenciam a taxa de recuperação dos oócitos, como, o tamanho do folículo, cuja taxa de recuperação é mais alta quando a maior

porcentagem de folículos aspirados tem menos de 10 mm de diâmetro, aparentemente porque a raspagem mecânica da parede do folículo é mais eficiente em um folículo menor (STOUT, 2020). Outro fator que interfere na taxa de recuperação é a frequência das aspirações foliculares, pois o número de folículos diminui quando a aspiração é realizada em intervalos inferiores a 11 dias (HINRICHS, 2012).

Após a OPU, a manipulação dos oócitos imaturos em estágio de vesícula germinativa é executada em temperatura ambiente (20 - 22°C), onde os oócitos podem ser mantidos em meio de manutenção de embriões por 16 -18 horas sem que haja qualquer efeito prejudicial nas taxas de maturação e produção de blastocisto *in vitro*. Contudo, isso permite o transporte dos oócitos equinos aspirados até um laboratório para o procedimento de ICSI e a sincronização do início da maturação oocitária, com o agendamento de técnicas de reprodução assistida (CHOI et al., 2006).

2.5.3 Recuperação de oócitos de ovários excisados post mortem

A recuperação dos oócitos post mortem pode ser a única opção para resgatar a genética de uma égua que veio a óbito. Neste caso, após a morte da égua os ovários são retirados e enviados para o laboratório para serem processados o mais rápido possível para a recuperação do oócito (SANSINEMA, 2020). Os oócitos recuperados dentro do período de 6 - 8 horas após a morte do animal, possui maior probabilidade de produzir embriões do que os oócitos recuperados em períodos mais prolongados (RIBEIRO et al., 2008).

Em relação ao transporte, os ovários são armazenados em caixa isotérmica, caso o deslocamento for em período curto de tempo de 0 - 2 horas. Neste caso os ovários são transportados à temperatura corporal (37°C) e para transporte mais longos em temperatura ambiente (21- 25°C) ou um pouco mais baixa (15 - 20°C) (HINRICHS, 2012).

Para recuperar os oócitos dos folículos de ovários equinos excisados, o procedimento consiste em abrir completamente cada folículo visível ou palpável usando um bisturi e raspar toda a superfície interna do folículo para remover a camada de células da granulosa (CLÉRICO et al., 2018). Essa técnica promove a completa recuperação do complexo cumulus oócitos (COCs), resultando em

bom desenvolvimento e maturação *in vitro* dos oócitos recuperados (HINRICHS et al., 2005; CHOI et al., 2006, 2007).

2.6. MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

O primeiro relato de oócitos maturados *in vitro* foi em 1981 por Fulka & Okolki, apresentando uma taxa de maturação de 68%, porém o primeiro embrião produzido de um oócito maturado *in vitro* foi em 1989 (FULKA; OKOLSKI, 1981; ZHANG et al., 1989).

O principal fator que determina o potencial de produção de embriões *in vitro* é a competência oocitária, ou seja, a capacidade do oócito concluir todas as etapas de maturação nuclear e citoplasmática; ser fecundado e completar o desenvolvimento embrionário inicial (MORRIS, 2018). No entanto, outro fator que influencia no tempo de duração da maturação *in vitro* é a morfologia do complexo do cumulus-oócitos (CCOs). Quando os oócitos são aspirados dos ovários as células do cumulus estão intactas e podem ser classificadas em compactas ou expandidas (ANGEL et al., 2020; THARASANIT et al., 2009).

Os oócitos aspirados com as células do cumulus compactadas requerem tempo de maturação de 30 - 36 horas para atingir MII, enquanto oócitos com o CCO expandido requerem um período de maturação *in vitro* (MIV) menor, de 22 - 24 horas (HINRICHS et al., 2005). Apesar disso, alguns estudos demonstraram que as taxas de maturação nuclear não aumentam após 30 horas de MIV (GOUDET., et al 2000). Com apresentação de melhores resultados nas taxas de produção de blastocistos, o período de 30 horas de maturação aparenta funcionar tanto para CCO expandido e compacto, portanto, acaba evitando essa diferença no tempo de MIV (MORRIS, 2018).

No entanto, antes da realização da MIV, os oócitos imaturos são mantidos em meios de manutenção em temperatura ambiente (20-22°C) durante 2- 12 horas (LAZZARI et al., 2020). Posteriormente, transferidos para o meio de maturação, numa incubadora com 5% de CO₂ a 38,2°C durante 28 – 30 horas (ANGEL et al., 2020).

Após este período, para avaliação da maturidade oocitária, é analisada a expansão das células do cumulus e a extrusão do corpúsculo polar. Isso é necessário para determinar se o oócito está ou não apto a ser fertilizado (McKINNON et al., 2011; DELL'AQUILA et al., 2003).

Em relação à composição do meio de maturação *in vitro*, os meios base mais comumente utilizados são o M199 e o DMEM/F-12. A principal diferença entre esses dois meios é a concentração de glicose (MORRIS, 2018). A concentração de glicose do M199 é de 5,5 mmol/L, do DMEM/F12 é de 17,5 mmol/L e já do fluido folicular da égua variam de 3,24 a 4,7 mmol/L. Todavia, pode ser que as diferenças nas concentrações de glicose durante a maturação possam afetar o desenvolvimento do oócito. Além disso, alguns estudos relatam que a utilização do meio DMEM/F12 para maturação dos oócitos aumenta as taxas de clivagem e produção de blastocisto, no entanto outro estudo indica taxas mais baixas de blastocisto para oócitos maturados em DMEM/F-12 do que em M199 (LAZZARI et al., 2020).

O meio base de maturação *in vitro* é suplementado por fonte de proteína (Soro Fetal Bovino- apresenta efeito benéfico na competência meiótica) hormônios (Hormônio Folículo Estimulante – FSH, Hormônio Luteinizante - LH, 17 β -estradiol), fatores de crescimento (Epidermal Growth Factor- EGF, Insulin Growth Factor- IGF) antibióticos (gentamicina, amicacina), antioxidantes (cisteamina, piruvato de sódio) (MORRIS, 2018; LAGUTINA et al., 2005; CHOY et al., 2016). Além das substâncias adicionadas ao meio base, os oócitos em cultivo também são afetados por condições fisiológicas específicas, tais como: osmolaridade, temperatura, pH, CO₂ e tensão de oxigênio, que, por sua vez, tornam-se parâmetros importantes que influenciam na capacidade de desenvolvimento do oócito (HUNTER, 2000).

Os laboratórios bem estabelecidos de produção *in vitro* de embriões equinos, alcançam altas taxas de maturação oocitária, acima de 60% atingem o estágio de metáfase II, adequado para a realização da técnica de ICSI e também apresentam altas taxas de clivagem após ICSI ($\geq 65\%$) (HINRICHS, 2012; MORRIS, 2018; STOUT, 2020).

2.7. INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE (ICSI)

A ICSI é uma técnica de reprodução assistida para a produção de embriões *in vitro*, na qual consiste na deposição (injeção) de um único espermatozoide dentro do ooplasma do oócito maduro por meio de uma agulha microscópica.

Na espécie equina a ICSI substitui a técnica convencional de fertilização *in vitro* (FIV) pelo fato de que está não obtém bons resultados, sendo os principais obstáculos o endurecimento da zona pelúcida do oócito durante o processo de maturação e a falha na ativação de espermatozoides (processo de capacitação) para penetração da zona pelúcida e do oolema de oócitos maturados *in vitro* (LAZZARI et al., 2020). Assim o procedimento da ICSI contorna estas barreiras durante o processo de fertilização se tornando a técnica fundamental para o sucesso de produção de embriões *in vitro* nos equinos. (SANSINEMA, 2020).

2.8. CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

O cultivo *in vitro* para o desenvolvimento embrionário é uma etapa bem desafiadora, apresentando uma taxa de produção de blastocistos por oócito submetido à ICSI de 23% - 30%, recuperados de folículos imaturos (STOUT, 2020; SANSINEMA, 2020; RADER et al., 2016).

Em programas de produção de embriões, os oócitos que são maturados *in vitro*, são fertilizados através da técnica de ICSI, e mantidos em meio de retenção pós-ICSI, o qual, é composto por um meio base M199, suplementado com 10% soro fetal bovino e mantidos em incubadora com 5% de CO₂ a 38,2°C durante um período de aproximadamente 2 horas. Os oócitos são transferidos em meio de cultura para embriões (RADER et al., 2016).

Para avaliação da clivagem dos embriões, no dia 5 após a ICSI, os embriões clivados são colocados em um novo meio de cultura para o desenvolvimento até a fase de blastocisto (RADER et al., 2016). A maioria dos protocolos de cultivo *in vitro* implementa uma mudança de meio a cada 2- 3 dias para minimizar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HIRICHS et al., 2007). Diversos laboratórios descrevem diferentes esquemas de troca de meio, como por exemplo, no dia 2 ou 3, ou dia 4 ou 5 (CHOI et al., 2003; TREMOLEDA et al., 2003). No entanto, altas taxas de produção de blastocistos foram relatadas quando o meio é trocado no dia 4 após ICSI (FOSS et al., 2013).

Os embriões produzidos *in vitro*, geralmente atingem o estágio de blastocisto nos dias 7 a 9 após a ICSI, quando são transferidos para uma égua receptora ou criopreservados (CUERVO-ARANGO et al., 2018). Os embriões são examinados diariamente do dia 7 ao dia 10 pós-ICSI para avaliação do

desenvolvimento do blastocisto (RADER et al., 2016). Os blastocistos produzidos *in vitro*, independentemente do dia da cultura que eles tenham se desenvolvido são comparados aos embriões *in vivo* do dia 6. Idealmente, os blastocistos produzidos *in vitro*, devem ser transferidos na receptora no dia 4-6 após a ovulação (CUERVO-ARANGO et al., 2018; RADER et al., 2016).

Em estudo de DUCHEYNE et al. (2019) relatou que embriões produzidos *in vitro* que atingem o estágio de blastocisto nos dias 10-12 de cultivo após a ICSI, esses embriões são menos propensos a um diagnóstico positivo de prenhez (3/11: 27 %) do que os embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto nos dias 6-9 após a ICSI (38/55: 69%).

No que diz respeito ao perfil metabólico o embrião equino, possui uma alta taxa de metabolismo de glicose, absorção de piruvato e produção de lactato, os quais, são indicadores úteis à viabilidade embrionária. Dessa forma, o cultivo *in vitro* é realizado entre os dias 0-4 com baixa concentração de glicose e do dia 5 em diante com alta concentração de glicose (LANE et al., 2001; AZUMA et al., 1995). O meio de cultura de embriões que tem sido consistentemente associado a altas taxas de desenvolvimento de blastocistos equinos é o DMEM/F12 (HINRICHS et al., 2005; CHOI et al., 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões equinos pela técnica de ICSI vem crescendo comercialmente e mundialmente; apresentando ser uma técnica desafiadora, com resultados oscilantes. Por essas razões, com o intuito de elucidar as alterações que levam às baixas taxas de produção de blastocistos viáveis, surge a necessidade de estudos e desenvolvimento de pesquisas voltadas à maturação, fertilização e ao cultivo *in vitro* dos embriões equin

REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. The Physiology of Early Pregnancy in the Mare. In: American Association of Equine Practitioners. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.46, p. 338-354, 2000.

ALVARENGA, M. A.; CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. New Assisted Reproductive Techniques Applied for the Horse Industry. Saunders Elsevier. In J. Sampe, p. 209–221, 2009.

ANGEL, D.; CANESIN, H. S.; BROM de LUNA, J.G.; MORADO, S.; DALVIT, G.; GOMEZ, D.; PUSADA, N.; PASCOTTINI, O.B.; URREGO, R.; HINRICHS, K.; VELZES, I.C. Embryo development after vitrification of immature and in vitro matured equine oocytes. **Criobiology**, v.92, p. 251-254, 2020

AZUMA, T.; CHOI, Y.H.; HOCHI, S.; OGURI, N. Effect of glucose in the culture medium on development of horse oocytes matured and microfertilized in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 1067-1071, 1995.

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

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.

CARNEVALE, M. E. Advances in Collection, Transport and Maturation of Equine Oocytes for Assisted Reproductive Techniques. Veterinary Clinics of North America - **Equine Practice**, v.32, p.379–399, 2016

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, p.38–47, 2007.

CHOI, Y.H.; GIBBONS, J.R.; CANESIN, H.S.; HINRICHS, K. Effect of medium variations (zinc supplementation during oocyte maturation, perfertilization pH, and embryo culture protein source) on equine embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 86, 1782-1788, 2016.

CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; LOVE, L.B.; HINRICHS, K. Effects of gas conditions, time of medium change, and ratio of medium to embryo on in vitro development of horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.59, p. 1219-1229, 2003.

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, p.955-963, 2006.

CHOI, Y.H.; VELEZ, I.C.; GARCIA, M.B.; RIERA, F.L.; BALLARD, C.S.; HINRICHS, K. Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. **Theriogenology**, v.85, p. 1289-1296, 2016.

CLAES, A.; ALLI, C.; COLLEONI, S.; NECCHI, D.; LAZZARI, G.; DEELEN, C.; BEITSMA, M.; STOUT, T.A. Factors influencing oocyte recovery and in-vitro production of equine embryos in a commercial OPU/ICSI program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.100, n.41, p.68-69, 2016.

CLÉRICO, G.; RODRÍGUEZ, M.B.; TAMINELLI, G.; BUTTERI, A.; VERONESI, J.C.; FERNÁNDEZ, S.; SALAMONE, D.; SANSINENA, M. Vitrication of Immature Oocytes for the Production of Equine Embryos by ICSI: Protocol Effect on Maturation, Embryo Development, Mitochondrial Distribution and Functionality. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p. 192-193, 2018.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.N.; STOUT, T. A. Effect of Embryo-Recipient Synchrony on Post-ET Survival of In Vivo and In Vitro-Produced Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p. 163-216, 2018.

DELL'AQUILA, M.E.; ALBRIZIO, M.; MARITATO, F.; MINOIA, P.; HINRICHS, K. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.68, n.6, p.2065-2072, 2003.

DUCHEYNE, K.D.; RIZZO, M.; CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.; DAELS, P.F.; STOUT, T.A.; RUIJTER-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, p. 1830- 9, 2019

FELIX, M. R.; TURNER, R.M.; DOBBIE, T.; HINRICHS, K. Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth o foals after prolonged sperm incubation for capacitation. **Biology of Reproduction**, v.107, p. 1551–1564, 2022.

FOSS, R.; ORTIS, H.; HINRICHS, K. Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.45, p. 39-43, 2013.

FULKA, J. Jr.; OKOLSKI, A. Culture of horse oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, p. 213-215, 1981.

GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v.81, p.138-15, 2014.

GERARD, 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. Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects. **Equiservices, Cross Plains**, 2º ed. p.642, 1992.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2º ed. Equiservices: Madison, Wisconsin, p. 642, 1992.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, p. 645-663, 1994.

GOUDET, G.; BELIN, F.; MLODAWSKA, W.; BEZARD, J. Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, 483-49, 2000.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. **Biology of Reproduction**, v.57, p. 232–245, 1997.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7º ed. São Paulo: Manole. 2004.

HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 4-11, 2018.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; LOVE, C.; WALCKENAER, B.E. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.72, p.1142–1150, 2005.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; NORRIS, J.D.; LOVE, L.B.; BEDFORD-GUAUS, S.J.; HARTMAN, D.L.; VELEZ, I.C. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.241, n.8, p.1070-1074, 2012.

HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; WALCKENAER, B.E.; VARNER, D.D.; HARTMAN, D.L. In vitro-produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. **Theriogenology**. v.68, p. 521-529, 2007.

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, p. 363-370, 1993.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43 – 101, 1991.

HIRSHFIELD, A.N. Heterogeneity of cell populations the contribute to the formation of primordial follicles in rats. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 466 – 472, 1992

HUNTER, M.G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. **Rev. Reproduction**, v.5, p.122-130, 2000.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23 – 32, 1997.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 1º ed. Editora Elsevier Ltda, p.56-68.2012.

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

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; PONDERATO, N.; TURINI, P.; CROTTI, G.; GALLI, C. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. **Reproduction**, v.130, p. 559-567,2005.

LANE, M.; O'DONOVAN, M.K.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.JR.; GARDNER, D.K. Assessment of metabolism of equine morulae and blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 33-37, 2001.

LAZZARI, G.; COLLEONI, S.; CROTTI, G.; TURINI, P.; FIORINI, G.; BARANDALLA, M.; LANDRISCINA, L.; DOLCI, G.; BENEDETTI, M.; DUCHI, R.; GALLI, C. Laboratory Production of Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.89, p. 737-803, 2020.

MCKINNON, A.O; SQUIRES, E.L; VAALA, W.E; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2º ed. Wiley-Blackwell, v. 2, part. IV, p. 2931-2953, 2011.

METCALF, S.E.; KEITH R.; MASTERSON, R. K.; BATTAGLIA, D.; THOMPSON, G. J.; FOSS. R.; BECKE, R.; COOK, L. N.; O'LEAR, T. Conditions to optimise the developmental competence of immature equine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 1012–1021, 2020.

MOORE, K.L.; PERSAUD. T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Básica**.9º ed. Editora Elsevier Ltda, p.23, 2016.

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

PAYNTON, B. V.; BACHVAROVA, R.; BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. Changes in maternal RNAs during oocyte maturation. In: **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, p. 25-34, 1990.

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.

RADER, K.; CHOI, Y.H.; HINRICHS, K. Intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and transfer of in vitro–produced blastocysts. *Veterinary Clinics of North America*: **Equine Practice**, v.32, p.401-413, 2016.

RIBEIRO, B.I.; LOVE, L.B.; CHOI, Y.H.; HINRICHS, K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.171–179, 2008.

SANSINENA, M. Assisted reproductive biotechnologies in the horse. **Reproductive Technologies in Animals**. p.13-27,2020.

SATHANANTHAN, A. H. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: Unique aspects of the human oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v. 27, p. 145-164, 1994.

SAUMANDE, J. Ovogenese et folliculogenese. **Rec. Med. Vet**, v.157, p. 29 – 38, 1981.

SOYAL, S. M.; AMLEH, A; DEAN, J. A germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. **Developmental Biology**, v. 127, p. 4645-4655, 2000.

STOUT, T.A.E. Clinical application of in vitro embryo production in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.89, p.1-6, 2020.

THARASANIT, T.; COLLEONI, S.; GALLI, C.; COLENBRANDER, T.A.E. Stout, Protective effects of the cumulus-corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. **Reproduction**, v.137, p. 391–401, 2009.

TREMOLEDA, J.L.; STOUT, T.A.E.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B.; GALLI, C. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1895-1906, 2003.

VIANA, J. H. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **In Embryo Technology Newsletter**, vol. 39, issue 4,2021.

VOGELSANG, M. M.; KRAEMER, D. C.; POTTER, G. D.; STOTT, G. G. Fine structure of the follicular oocyte of the horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p.157– 167, 1987.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, Nova Iorque, p.189-317, 1994.

ZHANG, J. J.; BOYLE, M. S.; ALLEN, W. R.; GALLI, C. Recent studies on in vivo fertilization of in vitro matured horse oocytes. **Equine Veterinary Journal**, v. 8, p. 101-104, 1989.

HIPÓTESE

O desenvolvimento de um meio MIV a base de TCM 199 pode melhorar a taxa de maturação in vitro e aumentar a quantidade e qualidade dos embriões produzidos in vitro.

OBJETIVOS

- Avaliar se a adaptação ao meio TCM 199 pode ser utilizado para maturação de oócito equino
- Verificar a competência do desenvolvimento dos oócitos cultivados in vitro entre o meio controle e TCM 199 (modificado) e a da produção de embriões através da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).



CAPÍTULO 2

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X,
raqueada como A2 pelo QUALIS-CAPES quadriênio 2013-2016.
<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

Nova composição de meio de maturação para a produção *in vitro* de embriões equinos

Mariana S. Frasson^{1*}, Frederico O. Papa¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brasil

* Autor para correspondência: m.frasson@unesp.br

RESUMO

A produção de embriões *in vitro* tem crescido ao longo da última década na indústria equina, dessa forma, a utilização de oócitos imaturos tornou-se uma prática padrão nos laboratórios de ICSI em todo o mundo. Perante a esse cenário, para obter taxas de sucesso, o meio de maturação é uma chave importante no processo de produção de embriões. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do meio de maturação na competência do desenvolvimento de oócitos equinos maturando *in vitro* e a produção de embriões por ICSI. O meio de maturação controle foi composto de DMEM/F-12 suplementado com FSH, LH, aditivos (ITS, EGF, IGF, piruvato) e 15% de SFB. Esse meio de maturação controle foi embasado ao de Lazzari (2020) do Laboratory Production of Equine Embryos, no entanto o meio de maturação experimental foi constituído de TCM199 com sais de Earle, suplementado com FSH, 17 β -estradiol, aditivos (ITS, EGF, IGF, piruvato) e 10% de SFB. Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram coletados por meio de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom e distribuídos aleatoriamente em dois grupos diferentes, posteriormente, mantidos em meio de manutenção durante o período de 5-12h de espera, em seguida os COCs foram transferidos para meio de maturação e

35 cultivados por 36 horas em incubadora de 5% CO₂ ao ar, em temperatura
36 38,2°C. Logo após os COCs foram então desnudados, visualização da extrusão
37 do corpúsculo polar, realização da ICSI e os presuntivos zigotos foram cultivados
38 em incubadora de 5%CO₂, 6%O₂ à 38,2°C. A clivagem foi verificada e as
39 células contadas no dia 3 após a ICSI, os blastocistos foram avaliados e
40 classificados (em uma escala de grau A-B-C) dos dias 7 a 10. As análises
41 estatísticas do grupo controle (GC) e grupo experimental (GE) foram efetuadas
42 pelo Teste Exato de Fisher. O nível de significância quando considerado
43 diferença estatística entre os grupos foi definido como $P < 0,05$. Não houve
44 diferença entre os grupos ($P > 0,05$) em degenerado (GC=15,7%, 13/83; GE=
45 9,5%, 8/84), estágio VG (GC=4,8%, 4/83; GE=6,0%, 5/84), presuntivos MI
46 (GC=4,8%, 4/83; GE=2,4%, 2/84) ou MII (GC=74,7%, 62/83; GE= 81,0%, 68/84)
47 oócitos avaliados após cultura de maturação. Em relação a taxa de clivagem no
48 dia 3 não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos (GC=72,2%, 39/54; GE=
49 67,9%, 38/56). Na contagem de células, o grupo controle apresentou maior ($P <$
50 $0,05$) número de embriões em estágio de 2 células no dia 3 (GC=13,0%, 7/54;
51 GE=1,8%, 1/56). No entanto, o grupo experimental mostrou tendência ($P = 0,07$)
52 de ter mais embriões no estágio de 8-16 células no dia 3 (GC=5,6%, 3/54;
53 GE=17,9%, 10/56). Não houve diferença na taxa de blastocisto ($P > 0,05$) entre
54 os grupos (GC=21,0%, 13/62; GE=23,5%, 16/68). Para a classificação dos
55 embriões, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos, nos três diferentes
56 graus (9,7%, 6/62 e 13,2%, 9/68 para o grau A; 6,5%, 4/62 e 10,3%, 7 /68 para
57 o grau B; e 4,8%, 3/62 e 0,0%, 0/68 para o grau C, os valores apresentados são
58 do grupo controle e experimental, respectivamente). Embora não houve
59 diferença estatística na maioria das variáveis, podemos observar que o grupo
60 experimental foi superior ao grupo controle. O grupo experimental mostrou
61 numericamente mais oócitos no estágio MII, menos embriões no estágio de 2
62 células e mais embriões no estágio de 8-16 células no dia 3. Da mesma forma,
63 podemos observar numericamente mais embriões de alta qualidade (grau A e B)
64 no grupo experimental do que no grupo controle. Ainda assim, com um número
65 total maior de oócitos, provavelmente encontraríamos diferenças estatísticas
66 nessas variáveis. Por este motivo estudos adicionais são necessários para
67 aprimorar a eficiência deste meio de maturação.

68 **Palavras-chave:** Oócitos, Meio de maturação, Clivagem, Cultivo *in vitro*
69 Produção de embriões.

70

71 **1. Introdução**

72 Nos últimos anos têm surgido um interesse significativo a respeito das
73 biotecnologias aplicadas na espécie equina, tanto relacionado ao
74 desenvolvimento de pesquisas quanto na utilização comercial para a produção
75 *in vitro* de embriões [1].

76 No entanto, a utilização destas biotecnologias possui alguns fatores
77 limitantes, principalmente relacionados à fisiologia reprodutiva da égua, que por
78 ser uma espécie monovulatória, possui apenas um ou dois folículos dominantes
79 durante cada ciclo estral [2]. Adicionalmente, devido a falta de um hormônio
80 comercialmente disponível, os protocolos de superovulação acabam não sendo
81 utilizados. Devido a estes motivos, quando se realiza a coleta, o número de
82 folículos pré-ovulatórios aspirados é baixo, sendo a maior população folicular de
83 folículos pequenos. Diante disto é preconizado a aspiração folicular de todos os
84 folículos pequenos presente no ovário com o objetivo de se ter maior
85 recuperação oocitária, no entanto, estes oócitos oriundos desses folículos
86 possuem grande quantidade de gotículas lipídicas [3] e fortes junções
87 comunicantes com as células da granulosa [4,5] dificultando a recuperação
88 através da aspiração folicular.

89 Além disso, a maturação *in vitro* (MIV) apresenta ser outro entrave na
90 produção de embriões. Os elementos que podem influenciar na maturação
91 oocitária são: osmolaridade, temperatura, pH, tensão de CO₂ e O₂, volume do
92 meio, presença de células do cumulus, adição de gonadotrofinas ao meio de
93 maturação e o tempo de cultivo dos oócitos [6]. A escolha do meio de cultura
94 usado na MIV equina é baseada em outras espécies [1], porém, as taxas de
95 maturação *in vitro* de oócitos equinos são baixas quando comparadas as de
96 outras espécies, geralmente em média 60% atingem o estágio de metáfase II em
97 equinos [7], comparado a 97% em bovinos [8].

98 Dessa forma, perante a esse cenário o processo de maturação oocitária
99 apresenta ser um ponto crítico para a produção de embriões *in vitro* [6]. Com
100 base nisso, é desejável a elaboração e adequação de um meio de maturação
101 que melhore as taxas de sucesso dentro de um laboratório de ICSI. Sendo assim,

o presente estudo tem como seu principal objetivo avaliar o efeito de um novo meio de maturação *in vitro* de oócitos equinos, através da utilização de uma nova composição de meio, analisando a competência do desenvolvimento de oócitos equinos maturados *in vitro* e a formação embrionária.

106

107 **2. Material e métodos**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ - UNESP – Botucatu/São Paulo), sob protocolo nº 0251/2022.

Todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co, (St Louis, Mo, USA) e meio de cultura da Thermo Fisher Scientific (São Paulo, SP, Brasil), a menos que seja especificado de outra forma.

115

116 *2.1 Animais e local de pesquisa*

Foram utilizadas 20 éguas, de diferentes raças com idade variando entre 7 e 15 anos, com boa condição corporal e históricos reprodutivos normais. Os animais foram mantidos em piquetes com livre acesso a água, sal mineral, feno e ração balanceada comercial.

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Embriologia da Central CH Reprodução Equina, localizada no município de Adamantina, estado de São Paulo, durante o período de outubro/2021 – abril/2022.

124

125 *2.2 Aspiração folicular*

Foram realizadas cinco sessões de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia, utilizando quatro (n=4) éguas por sessão. Antes de iniciar o procedimento de aspiração folicular o animal foi colocado no tronco de contenção e administrado sedativo, analgésico e espasmolítico (cloridrato de detomidina 5mg IV - butorfanol 1,5mg IV - butilbrometo de hioscina/buscofin 25 mg IV) para facilitar o procedimento e diminuir o desconforto.

O processo para aspiração dos folículos foi guiado por ultrassonografia (Mindray DP 50 power), utilizando-se um transdutor microconvexo de 5 MHz, encaixado em uma guia de aspiração, conjuntamente com uma agulha de calibre 12 G de duplo lúmen (WTA, Cravinhos, SP, Brasil), que apresenta uma cavidade

136 interna para a aspiração e uma pequena abertura externa para lavagem dos
137 folículos. A guia com o transdutor foi inserido por via transvaginal para a
138 visualização dos folículos através do ultrassom e o ovário manipulado por meio
139 da palpação transretal. Após a visualização dos folículos ovarianos, a agulha foi
140 inserida através do fundo do saco vaginal, perfurando o ovário e os folículos.
141 Após drenagem do fluido folicular, a parede folicular foi escarificada para
142 remoção dos COCs e o folículo foi lavado com meio de aspiração folicular. Esse
143 procedimento foi repetido, em média 6 vezes para cada folículo aspirado.

144 O meio de aspiração folicular é composto por DMPBS
145 (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) com 10% de soro fetal bovino e 1500 UI/L de
146 heparina. O meio de lavagem dos folículos foi introduzido por pressão manual
147 usando uma seringa plástica e a aspiração foi realizada utilizando uma bomba a
148 vácuo por pressão de 100 mmHg. Os COCs aspirados são armazenados em um
149 frasco estéril aquecido em banho-maria em temperatura de 38°C. Todos os
150 folículos presentes nos ovários contendo diâmetro ≥ 10 mm foram aspirados.
151 Após o término da aspiração, os COCs foram levados imediatamente para o
152 laboratório.

153

154 2.3 Lavagem e seleção dos oócitos

155 No laboratório, após término da sessão de aspiração, o conteúdo aspirado
156 armazenado no frasco estéril, foi filtrado pelo filtro de embriões de 75 micra
157 (WTA, Cravinhos, SP, Brasil), em seguida foi lavado suavemente com solução
158 de DMPBS, com auxílio da seringa de 20 mL e agulha 40x12. Logo após a
159 lavagem do filtro, o conteúdo filtrado foi transferido para uma placa de Petri de
160 100 mm e realizado rastreamento dos oócitos utilizando o estereomicroscópio.

161 Após identificados, os oócitos foram transferidos para meio holding
162 (TCM199 com sais de Hanks com 10% SFB) e divididos aleatoriamente em dois
163 grupos: controle e experimental. Os oócitos foram então transferidos para um
164 tubo de 5 mL (Falcon, Nova York, USA) contendo meio holding e mantidos em
165 incubadora portátil (TED, Cravinhos, Brasil) à 22°C, durante um período de 5-12
166 horas, após esse período foram transferidos para o meio de MIV.

167

168

169

170 2.4 *Maturação in vitro* (MIV)

171 Após o período de holding, os oócitos foram transferidos para os
172 respectivos meios de maturação. O meio de maturação do grupo controle foi
173 adaptado de [9], a base utilizada foi DMEM – F12 suplementado com 15% de
174 SFB, 1µL/mL insulina – transferrina -sodium selenite (ITS), fatores de
175 crescimento 50 ng/mL EGF, 100 ng/mL IGF), 0,1 UI/mL de FSH/LH
176 (Pergoveris/Luveris – Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1 mM de piruvato de
177 sódio e 75 µg/mL de amicacina.

178 O meio de maturação do grupo experimental foi composto por TCM199
179 com sais de Earle, suplementado com 10% de SFB, 1µL/mL de ITS, 50 ng/mL
180 de EGF, 100 ng/mL de IGF, 0,1 UI/mL de FSH (GONAL-f, Rio de Janeiro, RJ,
181 Brasil), 0,01 µg/µL 17β-estradiol (Sigma-Aldrich®), 1 mM de piruvato de sódio,
182 1Mm de cisteamina e 75 µg/mL de amicacina.

183 Para a realização da maturação *in vitro*, os CCOs foram cultivados em
184 placa de cultura estéril (35x10mm, Falcon, Nova York, USA), utilizando a
185 proporção de 10µl de meio por CCOs. A placa foi montada contendo 10 CCOs
186 em cada gota com 100 µL de meio de maturação, recobertas com óleo mineral
187 branco (Irvine Scientific, Santa Ana, Califórnia, USA). Os CCOs foram incubados
188 em 5% de CO₂ em ar, à 38,2°C durante 36 horas.

189

190 2.5 *Injeção intracitoplasmática de espermatozoides* (ICSI)

191 Após o período de MIV, o grau de expansão das células do cumulus foi
192 analisado e os COCs foram desnudados para visualização da extrusão do
193 primeiro corpúsculo polar. Para o desnudamento, as células do cumulus foram
194 retiradas com o auxílio de capilares de plástico de 150 e 125 µm de diâmetro
195 acoplado à um micropipetador (Stripper, Origio, Ballerup, Dinamarca, Europa),
196 utilizando-se uma solução de 0,05% de hialuronidase em holding. Os oócitos que
197 haviam extrusado o primeiro corpúsculo polar (estágio de metáfase II - MII) foram
198 destinados para a ICSI, os restantes foram visualmente classificados em:
199 degenerados, vesículas germinativas (GV) ou presuntivos MI e fixados em formol
200 10% para posterior coloração com DAPI [10] para confirmação do status da
201 cromatina, de acordo com Hirinchs [11].

202 Oócitos com corpúsculo polar visível foram submetidos à ICSI, como
203 descrito por Salgado [12]. Foi utilizado sêmen congelado de um garanhão de

204 fertilidade conhecida. Uma fração (aproximadamente um décimo) de uma
205 palheta de sêmen congelada foi cortada em nitrogênio líquido e descongelada
206 em 1 ml GMOPS (Vitrolife, Englewood, CO, EUA) suplementado com 10% de
207 FBS, em um tubo Falcon de 5 mL, por 60 segundos à 38°C. Em seguida o sêmen
208 descongelado foi centrifugado a 400 × g por 4 minutos. O sobrenadante foi então
209 removido com o auxílio de uma pipeta e o sedimento foi ressuspendido em 1 mL
210 de GMOPS 10% e centrifugado novamente. O sobrenadante, mais uma vez foi
211 removido e o pellet com os espermatozoides foi misturado com o restante do
212 meio (aproximadamente 10 µL).

213 Com o sêmen já processado, foi realizado o preparo da placa de ICSI, da
214 seguinte forma: utilizando uma placa de Petri de 60 mm (Falcon, Nova York,
215 USA), distribuindo as gotas com os oócitos na parte lateral da placa e a gota com
216 os espermatozoides no meio da placa. Para o preparo da gota com os
217 espermatozoides, foi adicionado meio Sperm Catch (Nidacon, Mölndal, Suécia),
218 onde foi adicionado 1 µL do sêmen processado. Os oócitos foram mantidos em
219 gotas separadas de 5 µL (dois oócitos por gota) de meio holding.

220 Para o procedimento de ICSI, foi utilizado um microscópio invertido
221 (Axiovert, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipado com dois
222 micromanipuladores, um microinjetor pneumático (holding, para segurar o
223 oócito) e um microinjetor a óleo (injection, para injetar o espermatozoide)
224 acoplado ao piezzo drill (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

225 A ICSI foi realizada utilizando a técnica ICSI piezo [12], na qual uma
226 micropipeta de injeção de ponta romba recebe microvibrações acionadas pelo
227 piezo drill para romper a membrana plasmática do espermatozoide, penetrar a
228 zona pelúcida e no oolema do oócito, depositando o espermatozoide diretamente
229 no ooplasma.

230 Para o processo de fertilização do oócito, apenas um único
231 espermatozoide móvel com morfologia aparentemente normal foi escolhido, a
232 pipeta de injeção imobilizou o espermatozoide com a cauda para dentro da
233 pipeta. No momento que a peça intermediária fica na borda da pipeta da injection
234 os pulsos de piezo foram aplicados para imobilização do espermatozoide. Já o
235 oócito foi fixado pela pipeta de holding, o corpúsculo polar posicionado às 6:00
236 ou 12:00 e a pipeta de injeção foi introduzida na zona pelúcida e membrana

237 plasmática do oócito, na posição de 3 horas para a injeção de espermatozoide
238 no ooplasma [12].

239 *2.6 Cultivo e avaliação embrionária*

240 Os oócitos injetados pela técnica de ICSI foram incubados em TCM199
241 com sais de Earle suplementado com 10% FBS (pós-ICSI holding) em 5% CO₂
242 à 38,2°C por 30 minutos.

243 Logo após este período, os oócitos injetados foram então transferidos e
244 cultivados em microgotas de 15µL, utilizando o meio comercial de cultura Global
245 (Global medium, LifeGlobal, Guilford, Connecticut, EUA) suplementado com 10%
246 FBS, utilizando a proporção de 5 a 7,5 µl meio/oócito, com 2-4 embriões/gota. O
247 ambiente de cultivo foi de 5% CO₂ 6% O₂ em temperatura de 38,2°C.

248 No dia 3 após a ICSI avaliou-se a clivagem e o número de células dos
249 embriões foram contadas. Os oócitos injetados não clivados foram fixados em
250 formol 10% para posterior coloração com DAPI para avaliação da cromatina [13].
251 No dia 5 após a ICSI o meio de cultivo embrionário foi trocado para DMM/F-12
252 suplementado com 10% FBS.

253 A avaliação embrionária para detecção da formação de blastocistos e
254 classificação morfológica foi realizada do dia 7 a 10 após a ICSI. Os embriões
255 foram classificados da seguinte forma: Grau A – embriões que se tornaram
256 blastocistos nos dias 7 ou 8 após a ICSI com boa qualidade; Grau B – embriões
257 que se tornaram blastocistos nos dias 7 ou 8 com qualidade moderada e nos
258 dias 9 ou 10 com boa qualidade; Grau C – embriões que se tornaram blastocistos
259 nos dias 7 ou 8 com qualidade ruim ou nos dias 9 ou 10 com qualidade moderada
260 ou ruim.

261

262 *2.7 Análise estatística*

263 Para avaliação das análises estatísticas, para cada variável foi utilizado o
264 Teste Exato de Fisher, com o nível de significância $P < 0,05$ e tendência definida
265 como $0,05 < P < 0,1$.

266

267 **3. Resultados**

268 Após o período de MIV, os COCs foram desnudos das células do cumulus
269 e os oócitos foram classificados em degenerados, vesículas germinativas (VG),
270 MI ou MII. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos para oócitos

degenerados (15.7%,13/83 e 9.5%, 8/84), VG (4.8%, 4/83 e 6.0%, 5/84), MI (4.8%, 4/83 e 2.4%, 2/84) e MII (74.7%, 62/83 e 81.0%, 68/84) para grupo controle e experimental, respectivamente (Tabela 1).

274

Tabela 1. Taxa de oócitos degenerados, vesículas germinativas, MI e MII após maturação com dois diferentes meios.

Grupo	Degenerados	VG	MI *	MI
Controle (GC)	15.7% (13/83)	4.8% (4/83)	4.8% (4/83)	74.7% (62/83)
Experimental (GE)	9.5% (8/84)	6.0% (5/84)	2.4% (2/84)	81.0% (68/84)

No dia 3 após a ICSI, quando o número de células foi contado e as taxas de clivagem foram avaliadas em relação aos oócitos injetados, o grupo controle apresentou maior número de embriões em estágio de duas células (13.0%, 7/54) quando comparado ao grupo experimental, apresentando diferença significativa. (1.8%, 1/56; $P < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$) em números de embriões nos estágios de 2-4 células, 4-8 células e >16 células, no entanto o grupo experimental (17.9%, 10/56) apresentou tendência ($P = 0.07$) a possuir mais embriões no estágio de 8-16 células quando comparado ao grupo controle (5.6%, 3/54). Não houve diferença ($P > 0,05$) no total de embriões clivados entre os grupos (Tabela 2).

287

Tabela 2. Número de células e taxa de clivagem por oócitos injetados para diferentes meios de maturação no dia 3 após ICSI.

Grupo	2 cel	2-4 cel	4-8 cel	8-16 cel	>16 cel	Total CL
GC	13.0% (7/54) ^a	18.5% (10/54)	35.2% (19/54)	5.6% (3/54)*	0.0% (0/54)	72.2% (39/54)
GE	1.8% (1/56)	12.5% (7/56)	35.7% (20/56)	17.9% (10/56)	0.0% (0/56)	67.9% (38/56)

* Tendência à diferença estatística. GC: controle GE: grupo experimental

Quando avaliamos a clivagem em relação ao número de oócitos aspirados, o resultado foi semelhante ao observado em relação aos oócitos injetados, ressaltando que o grupo controle apresentou mais embriões ($P < 0,05$) em estágio de duas células (8.4%, 7/83) e tendência ($P = 0,08$) a ter menos embriões no estágio de 8-16 células (3.6%, 3/83) quando comparado ao grupo experimental descrito na tabela 3.

Tabela 3. Número de células e taxa de clivagem por oócitos aspirados para diferentes meios de maturação no dia 3 após ICSI.

Grupo	2 cel	2-4 cel	4-8 cel	8-16 cel	>16 cel	Total CL
GC	8.4% (7/83) ^a	12.0% (10/83)	22.9% (19/83)	3.6% (3/83)*	0.0% (0/83)	47.0% (39/83)
GE	1.2% (1/84)	8.3% (7/84)	23.8% (20/84)	11.9% (10/84)	0.0% (0/84)	45.2% (38/84)

* Tendência à diferença estatística GC: grupo controle GE: grupo experimental

Na avaliação dos blastocistos e qualidade embrionária, quando as taxas foram analisadas em relação aos oócitos injetados, constatou-se que ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$) nos diferentes graus de classificação embrionária e total de blastocistos (Tabela 4). Entretanto, podemos observar que o grupo experimental apresentou numericamente mais embriões de melhor qualidade (A e B).

Tabela 4. Taxa de blastocistos por oócitos injetados para diferentes meios de maturação.

Grupo	BL A	BL B	BL C	Total BL
Controle	9.7% (6/62)	6.5% (4/62)	4.8% (3/62)	21.0% (13/62)
Experimental	13.2% (9/68)	10.3% (7/68)	0.0% (0/68)	23.5% (16/68)

Em relação a produção de blastocisto por oócitos aspirados também não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos quando analisamos as diferentes categorias, BL-A (7.2% 6/83; 10.8% 9/84), BL-B (4.8% 4/83; 8.8% 7/84), BL-C (3.6% 3/83; 0.8% 0/84) e Total BL (15.7% 13/83; 19.8% 16/84), dados descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Taxa de blastocistos por oócitos aspirados para diferentes meios de maturação.

Grupo	BL A	BL B	BL C	Total BL
Controle	7.2% (6/83)	4.8% (4/83)	3.6% (3/83)	15.7% (13/83)
Experimental	10.8% (9/84)	8.8% (7/84)	0.8% (0/84)	19.8% (16/84)

Em relação aos oócitos e os embriões fixados no formol para avaliação da cromatina pela coloração de DAPI, não foi possível realizar essa análise pois o material genético ficou degenerado, provavelmente pelo tempo prolongado que ficou fixado no formol.

324 4. Discussão

325 O presente estudo avaliou uma nova estratégia de meio de maturação *in*
326 *vitro* para oócitos equinos, através da avaliação do potencial de desenvolvimento
327 dos oócitos e produção embrionária por meio da ICSI. O meio de maturação
328 utilizado como controle foi baseado em um meio bem estabelecido
329 mundialmente na produção *in vitro* de embriões equinos [9]. As principais
330 diferenças entre os dois meios foi o meio base, sendo que o controle é
331 constituído DMEM/F-12, enquanto o meio experimental é constituído por
332 TCM199. Além disso, a composição hormonal difere entre os dois meios,
333 enquanto o controle possui LH e FSH, o experimental utiliza apenas FSH como
334 gonadotrofina e apresenta o incremento do estradiol.

335 Como os COCs apresentam alto consumo de glicose durante o processo
336 de maturação *in vitro* [1], poderíamos pressupor que um meio com alta
337 concentração de glicose poderia ser benéfico para o desenvolvimento e
338 maturação oocitária. No entanto, não houve diferença estatística tanto na taxa
339 de maturação quanto na produção de embriões para os diferentes meios
340 testados (DMEM/F-12 possui 17,5 mmol/L e TCM199 possui 5,5 mmol/L de
341 glicose). Estes achados corroboram com os de LEWIS [14], onde uma
342 concentração elevada de glicose, mas causou uma diminuição no índice
343 glicolítico e uma modificação significativa na função mitocondrial do COCs, no
344 entanto não influenciou o consumo de glicose nem a taxa de maturação e
345 produção de embriões.

346 Quando analisada a adição do LH em meios de maturação de oócitos
347 equinos, Willis [15] observaram que COCs cultivados com a adição de LH bovino
348 em concentrações crescentes obtiveram taxas de maturação semelhantes, em
349 torno de 40%, verificando que a adição do LH não afeta o índice de maturação.
350 Desta forma, no presente estudo não houve adição de LH no grupo experimental.

351 De acordo com Carneiro [16], o fator de crescimento à insulina I (IGF-I)
352 tem efeito positivo na maturação nuclear em oócitos equinos maturados *in vitro*.
353 Além disso, demonstrou que a adição de IGF-I no meio de maturação *in vitro*
354 juntamente com FSH, LH, estradiol (E2) e SFB não aumenta a maturação
355 nuclear mas promove maturação citoplasmática. Outros estudos detectaram
356 receptores para o fator de crescimento epidermal (EGF) nos folículos, sendo
357 mais proeminentes das células do cumulus e da granulosa, sugerindo a ação do

358 EGF como mediador parácrino na sinalização de LH, dando início ao processo
359 de maturação [17].

360 Durante a MIV ocorre produção de radicais livres, que são prejudiciais
361 para o desenvolvimento dos oócitos [18]. Como alternativa, para melhorar o
362 ambiente do cultivo, adicionamos no meio experimental a cisteamina como
363 antioxidante, por ser um aminotiol capaz de reduzir importantes moléculas de
364 dissulfeto oxidadas, auxiliando na proteção contra o stress oxidativo [19]. Além
365 disso, utilizamos ITS como suplementação para o meio experimental. A insulina
366 é um hormônio polipeptídico que promove a absorção de glicose e aminoácidos,
367 podendo, por este motivo, apresentar um efeito mitogênico. A transferrina é uma
368 proteína de transporte de ferro e o selênio é um oligoelemento essencial,
369 normalmente fornecido pelo soro [18,20,21]. Adicionalmente, foi utilizado
370 piruvato de sódio, importante para o metabolismo do oócito e como antioxidante.
371 Foi demonstrado que a combinação de glicose e piruvato no meio resulta em
372 maiores taxas de maturação para o COCs em camundongos [22]. Todos estes
373 aditivos utilizados são semelhantes em ambos os meios, com exceção da
374 cisteamina, presente apenas no meio experimental, podendo esta ser uma
375 possível fonte das vantagens observadas neste meio, como melhor
376 desenvolvimento embrionário no dia 3 após a ICSI, e embriões de melhor
377 qualidade.

378 Para avaliação da eficácia dos meios de maturação *in vitro* foi analisado
379 a taxa de maturação dos oócitos que atingiram o estágio de MII, tanto o grupo
380 controle (74.7%, 62/83) como o experimental (81.0%, 68/84) apresentaram boas
381 taxas de maturação *in vitro* comparadas com outros estudos, que apresentam
382 taxas entre 50 e 67% [23,24,25,26]. No presente estudo, não houve diferença
383 estatística na taxa de MII entre os grupos, no entanto, o grupo experimental
384 apresentou uma taxa numericamente superior ao grupo controle.

385 A taxa de clivagem um indicador da produção esperada de blastocistos,
386 diante desse fato, neste experimento foi avaliado a taxa de clivagem do grupo
387 controle apresentando 72.2% (39/54) de embriões clivados após a ICSI e o grupo
388 experimental 67.9% (38/56). Apesar de não haver diferença entre os grupos,
389 esses valores são semelhantes aos de outros estudos, que indicam a taxa de
390 clivagem de 65% a 75% [27,28,29,30].

391 Em relação à contagem de células no dia 3 após a ICSI, o grupo controle
392 (13,0%; 7/54) apresentou maior quantidade de embriões com 2 células em
393 relação ao grupo experimental (1.8%; 1/56), mostrando que os embriões com 2
394 células tiveram atraso em seu desenvolvimento. Similarmente, o grupo
395 experimental apresentou uma tendência a possuir maior quantidade de embriões
396 com 8-16 células (17.9%; 10/56) em relação ao grupo controle (5.6%; 3/54),
397 reafirmando a hipótese de que os embriões do grupo controle possuem
398 crescimento mais lento em relação aos embriões do grupo experimental. No dia
399 3 após a ICSI é esperado que os embriões apresentem, em média, de 8 a 16
400 células. Não conhecemos nenhuma literatura que compare o meio de maturação
401 com o número de células de embriões equinos provenientes de ICSI, no dia 3
402 após o cultivo embrionário.

403 Galli e colaboradores [31] observaram uma clara vantagem no uso de um
404 meio à base de DMEM-F12 não apenas na taxa de clivagem, mas também no
405 desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto. Contrariamente, no
406 presente trabalho não observamos diferença estatística na taxa total de clivagem
407 (GC 72.2%, 39/54 GE 67.9% 38/56) e de blastocistos, no entanto o grupo
408 experimental (23.5%, 16/68), à base de TCM199 apresentou vantagem numérica
409 em relação ao controle (21.0%, 13/62), à base de DMEM/F-12.

410 Para a avaliação do desenvolvimento do embrião em estágio de
411 blastocisto os embriões são examinados diariamente do dia 7 ao dia 10 após a
412 ICSI. Diversos estudos apontam que a produção de blastocisto pode ser
413 esperada entre 20% e 35% para oócitos imaturos [23,24,25]. No entanto, em
414 programas comerciais a taxa de produção varia entre 20 e 23% [30,32]. No nosso
415 experimento, ambos os grupos apresentaram resultados semelhantes aos
416 apresentados por laboratórios comerciais de produção *in vitro* de embriões
417 equinos. Apesar de não ter havido diferença estatística em números de
418 blastocistos nas diferentes categorias de avaliação embrionária (A-B-C),
419 podemos observar que o grupo experimental apresentou numericamente mais
420 embriões de melhor qualidade (A e B). Porém uma das razões por não ter havido
421 diferença estatística pode ser devido ao baixo número de oócitos e embriões

422 Quando analisamos os dados de clivagem e blastocistos, observamos
423 uma grande diferença em percentual ao avaliar em relação aos oócitos aspirados
424 ou oócitos injetados. Isso se deve especialmente à taxa de maturação, quanto

425 mais baixa a taxa de maturação, maior será a diferença entre as taxas. Desta
426 forma, acreditamos ser importante expressar também as taxas em relação aos
427 oócitos aspirados.

428 Sabendo que o processo de maturação *in vitro* é um fator crítico para a
429 produção de embriões, os meios de maturação utilizados no presente estudo
430 foram eficazes para promover a maturação *in vitro* dos oócitos equinos, sendo
431 uma alternativa para melhorar a competência oocitária, favorecendo o
432 desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*. Ainda assim, com um maior
433 número total de oócitos, provavelmente encontraríamos diferenças estatísticas
434 nos dados analisados. Por este motivo, estudos adicionais são necessários para
435 aprimorar a eficiência deste meio de maturação.

436

437 **Agradecimentos**

438 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
439 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

440

441 Referências

- 442 [1] Lewis N, Hinrichs K, Leese HJ, Argo CM, Brison DR, Sturmey R. Energy
443 metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation.
444 Scientific Reports 2020; 10:34-93.
- 445 [2] Ginther, OJ. Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects.
446 Equiservices, Cross Plains, 2º ed, 1992; 642.
- 447 [3] Vogelsang, MM, Kraemer DC, Potter GD, Stott GG. Fine structure of the
448 follicular oocyte of the horse. Journal of Reproduction and Fertility 1987;35;157–
449 167.
- 450 [4] Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E. Equine oocyte
451 competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size
452 and hormonal environment. Biology of Reproduction 1997;57; 232–245.
- 453 [5] Metcalf SE, Keith R, Masterson RK, Battaglia D, Thompson GJ, Foss R, Becke
454 R, Cook LN. O'lear, T. Conditions to optimise the developmental competence of
455 immature equine oocytes. Reproduction, Fertility and Development 2020;1012–
456 1021.
- 457 [6] Fernandes CB. Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre os
458 meios TCM 199, SOFaa e HTF: BME, e avaliação da adição de fsh bovino, FSH
459 eqüino e do hormônio de crescimento eqüino por meio da transferência de
460 ovócitos. Dissertação (mestrado na área de reprodução animal) Faculdade de
461 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de
462 Mesquita Filho, Botucatu/SP 2004.
- 463 [7] Stout, TAE. Clinical application of in vitro embryo production in the horse.
464 Journal of Equine Veterinary Science 2020;89:1-6.
- 465 [8] Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada. A In vitro
466 fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by
467 cumulus cells and matured in vitro. Theriogenology 1988; 30: 489-495.
- 468 [9] Lazzari G, Colleoni S, Crotti G, Turini P, Fiorini G, Barandalla M, Landriscina
469 L, Dolci G, Benedetti M, Duchi R, Galli C. Laboratory Production of Equine
470 Embryos. Journal of Equine Veterinary Science 2020; 89: 737-803.
- 471 [10] Canesin HS, Brom-de-Luna JG, Choi YH, Ortiz I, Diaw M, Hinrichs K.
472 Blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection of equine oocytes
473 vitrified at the germinal-vesicle stage. Cryobiology. 2017; 75:52-59.
- 474 [11] Hinrichs K, Schmidt AL. Meiotic competence in horse oocytes: interactions
475 among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season.
476 Biol Reprod 2000;62(5):1402-1408.
- 477 [12] Salgado RM, Brom-de-Luna JG, Resende HL, Canesin HS, Hinrichs K.
478 Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects
479 delayed sperm component remodeling and oocyte activation. Journal of Assisted
480 Reproduction and Genetics 2018; 35: 825-840.

- 488 [13] Canesin HS, Brom-de-Luna JG, Choi YH, Pereira AM, Macedo GG, Hinrichs
489 K. Vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes: Effect of cryoprotectant
490 exposure time on in-vitro embryo production. *Cryobiology* 2018; 81: 185-191.
491
- 492 [14] Lewis N, Hinrichs K, Leese HJ, Argo CM, Brison RD, Sturmey RG. Glucose
493 concentracion during equine in vitro maturation alters mitochondrial function.
494 *Society Reproduction and Fertility* 2020; 160: 227–237.
- 495 [15] Willis P, Caudle AB, Fayrer-Hosken R. A Equine oocyte in vitro maturation:
496 influences of sera, time and hormones. *Molecular Reproduction Development*
497 1991; 30: 360- 368.
498
- 499 [16] Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pengoraro L, Bertolini M, Ball B,
500 Anderson G, Liu, I. Influence of Insulin-like growth factor – I and its interacion with
501 gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and
502 parthenogenic development in equine oocytes. *Biology of Reproduction* 2001; 65:
503 899-905.
504
- 505 [17] Lindbloom SM, Farmerie TA, Clay CM, Seidel Jr GE, Carnevale EM.
506 Potential involvement of EGF like growth factors and phosphodiesterases in
507 initiation of equine oocyte maturation. *Animal Reproduction Science* 2008;
508 103:187–192.
- 509 [18] Kim S, Lee GS, Lee SH, Kim HS, Jeong YW, Kim JH, Kang SK, Lee BC,
510 Hwang WS. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its
511 receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by in vitro
512 fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Molecular Reproduction and*
513 *Development* 2005; 72: 88–97.
- 514 [19] Besouw M, Masereeuw R, Heuvel L, Levtchenko E. Cysteamine: an old drug
515 with new potencial. *Drug Discovery Today* 2013; vol18 (15-16): 785-792.
- 516 [20] Wilcox G. Insulin and Insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*
517 2005; 26(2): 19-39.
- 518 [21] Laur N, Kinscherf R, Pomytkin K, Kaiser L, Knes O, Deigner HP. ICP-MS
519 trace element analysis in serum and whole blood. *Journals Plos One* 2020;15(5).
- 520 [22]Downs SM, Hudson ED. Energy substrates and the completion of
521 spontaneous meiotic maturation. *Zygote* 2000; 8: 339–351.
- 522 [23] Clérico G, Rodriguez MB, Taminelli G, Butteri A, Veronesi JC, Fernandez S.
523 Vitrification of immature oocytes for the production of equine embryos by ICSI:
524 protocol effect on maturation, embryo development, mitochondrial distribution
525 and functionality. *Journal of Equine Veterinary Science* 2018; 66:192-193.
526
- 527 [24] Hinrichs K. In vitro production of equine embryos: state of the art.
528 *Reproduction in Domestic Animals* 2010; 45:3-8.
529
- 530 [25] Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K. Factors affecting developmental
531 competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection.
532 *Reproduction* 2004; 127(2):187-194.
533

- 534 [26] Hinrichs K. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction,*
535 *Fertility and Development* 2013;25: 80-93.
536
- 537 [27] Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Ovum pick up, intra-
538 cytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo
539 and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*
540 2014; 81:138-151.
- 541 [28] Foss R, Ortis H, Hinrichs K. Effect of potential oocyte transport protocols on
542 blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse. *Journal of*
543 *Equine Veterinary* 2013; suppl: 39-43.
- 544 [29] Morris LHA. The development of in vitro embryo production in the horse.
545 *Equine Veterinary Journal* 2018; 50:712-720.
- 546 [30] Rader K, Choi YH, Hinrichs, K. Intracytoplasmic sperm injection, embryo
547 culture, and transfer of in vitro–produced blastocysts. *Veterinary Clinics of North*
548 *America: Equine Practice* 2016; 32: 401-413.
- 549 [31] Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. Developmental
550 competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures
551 ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and
552 somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 2006; 98: 39–55.
- 553 [32] Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TAE. Mare and stallion effects on
554 blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up-intracytoplasmic
555 sperm injection program. *Reproduction, Fertility and Development* 2019;
556 31:1894-1903.