

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/01/2025.

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

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

MARIANA LEMOS NAGIB JORGE

Botucatu, SP
Janeiro - 2023

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

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

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

Mariana Lemos Nagib Jorge

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

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

Botucatu, SP
Janeiro - 2023

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

Jorge, Mariana Lemos Nagib.

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

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Coorientador: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Capes: 50504002

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

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

Nome da autora: Mariana Lemos Nagib Jorge

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

BANCA EXAMINADORA

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

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP Botucatu – SP

Prof.^a Dr.^a Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP Botucatu – SP

Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

UFMG, Belo Horizonte – MG

Data da Defesa: 27 de janeiro de 2023.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

Keywords: assisted reproduction, fertility, ICSI, oocyte maturation

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

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

Capítulo 2

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

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

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB = β -actin

AMPC = monofosfato de adenosina cíclica

AREG = Ampirregulina

ATP = adenosina trifosfato

BMP15 = Proteína Morfogenética Óssea 15

Botu = Botuembryo

Butiro = Butirolactona

CC = célula do cumulus

CDK = quinase dependente de ciclina

cDNA = DNA complementar

CEUA = comitê de ética no uso de animais

Cit Im = citoplasma imaturo

Cit Mad = citoplasma maduro

CL = corpo lúteo

CO₂ = gás carbônico

COC = complexo cumulus-oócito

CONCEA = Conselho nacional de experimento animal

CP = corpúsculo polar

Ct = ciclo de threshold

Cx37 = Conexina 37

Cx43 = Conexina 43

D = degenerado

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

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNase = desoxirribonuclease

DP = desvio padrão da média

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM = erro padrão da média

ESD = *extreme studentized deviate*

FIV = fertilização *in vitro*

FSH = hormônio folículo estimulante

FSHR = receptor de FSH

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

SUMÁRIO

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

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

5. REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

24 RESUMO

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

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

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

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

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

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

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

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

68

69

70

71

72

73

5. CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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