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

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

Mariana Degli Esposti

Botucatu
2025

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

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

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

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

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Junior

Botucatu
2025

E77e

Esposti, Mariana Degli

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

58 p. : fotos

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

Orientador: José Buratini

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

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

Nome da autora: Mariana Degli Esposti

Atada defesa da dissertação: 29 de Agosto de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Buratini Junior

Presidente e Orientador

Departamento de Fisiologia

Botucatu/ SP

Prof. Dr. Anthony Cesar de Souza Castilho

Membro

Departamento de Fisiologia

Presidente Prudente/SP

Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal

Membro

Departamento de Biotecnologia da reprodução

Pirassununga/SP

DEDICATÓRIA

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVEATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina

BSA – Albumina sérica bovina

CDKs – Ciclinas

COCs – Complexos cumulus-oócito

cGMP – Monofosfato de guanosina cíclico

E2 – Estradiol

FBS – Soro fetal bovino

FIV – Fecundação in vitro

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GV – Vesícula germinativa

GVBD – Rompimento da vesícula germinativa (Germinal Vesicle Breakdown)

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

IA – Inseminação artificial

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (Intracytoplasmic Sperm Injection)

LH – Hormônio luteinizante

MAPK – MAP quinase

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

mRNA – RNA mensageiro

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

OPU – Ovum pick-up (aspiração folicular transvaginal)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PDE3 – Fosfodiesterase 3

PDE3A – Fosfodiesterase 3A

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

PIVE – Produção in vitro de embriões

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

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

SEAPA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

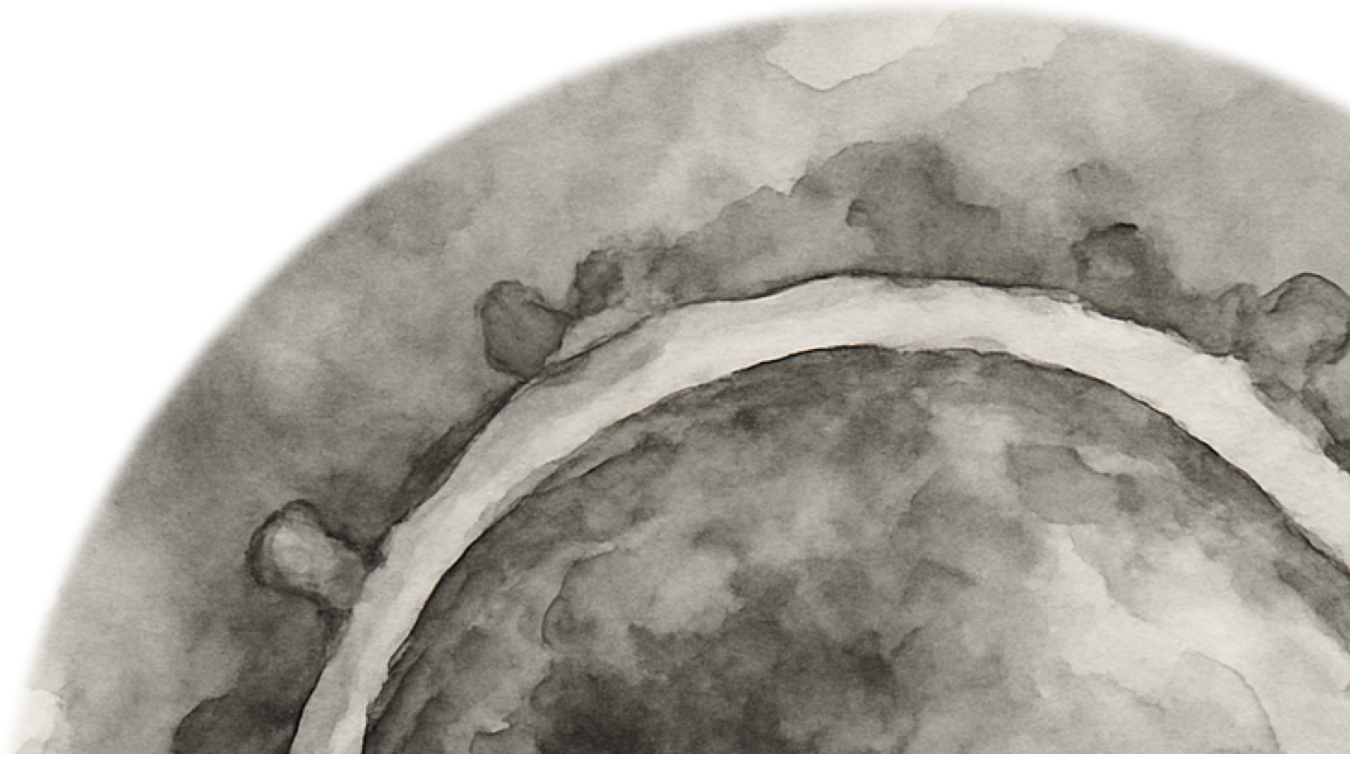
TE – Transferência de embriões

SUMÁRIO

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

CAPÍTULO 1

Aspectos Biológicos e Moleculares da Maturação Oocitária: Revisão de Literatura



Resumo

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Revisão de literatura

2.1 Aspectos Fisiológicos do Ciclo Estral em Éguas

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

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

2011). Esse estímulo inibe a produção de melatonina pela glândula pineal, cuja síntese ocorre predominantemente durante a noite. A redução nos níveis séricos de melatonina, estimula à secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, o qual age sobre a adeno-hipófise, promovendo a liberação dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (Hafez e Hafez, 2004). As gonadotrofinas atuam diretamente nos ovários, desencadeando uma sequência de eventos fisiológicos que envolvem o recrutamento, a seleção e a dominância folicular, culminando na ovulação.

Esse processo neuroendócrino marca o retorno da atividade cíclica nas éguas, que, quando não gestantes, apresentam ciclos estrais com duração média de 21 dias (Palmer e Guillaume, 1992). Este ciclo pode ser dividido em quatro fases principais: proestro, estro, diestro e anestro, cada uma caracterizada por alterações hormonais e comportamentais distintas que refletem a preparação do organismo para a reprodução.

O proestro, tem como marco inicial a regressão do corpo lúteo, que ocorre no fim do diestro, quando o endométrio libera prostaglandina $F_2\ \alpha$ ($PGF_2\ \alpha$), nesse período, um ou mais folículos ovarianos entram em maturação e passam a secretar estrógeno (Gomes, 2003). Estro é a fase em que o folículo dominante atinge pleno desenvolvimento e continua a secretar estrógeno, o qual é responsável por induzir o comportamento de receptividade da égua ao garanhão, esse período é considerado o mais fértil do ciclo, coincidindo com a ovulação iminente (Lage, 2007; Porto, 2007). No diestro, a égua permanece em estado de não receptividade sexual, independentemente de ter ocorrido fecundação. Nesse período, o corpo lúteo, formado a partir do folículo pós-ovulatório, encontra-se funcional e secreta progesterona, hormônio essencial para manter um ambiente uterino favorável à implantação e ao suporte inicial da gestação, quando presente (Samper, 2008). Por fim, a fase de anestro corresponde a um período de inatividade ovulatória. Essa fase ocorre, predominantemente, em épocas do ano com baixa incidência de luz solar, o que reduz a liberação de GnRH pelo hipotálamo e, consequentemente, de FSH e LH pela hipófise anterior (Bisol, 2007).

O controle endócrino do ciclo estral em éguas é mediado pelo eixo hipotálamo–hipófise–gônadas, cuja atividade sazonal é regulada principalmente pelo fotoperíodo (revisado por Colazo & Mapletoft, 2014). A secreção de FSH promove o recrutamento e o crescimento inicial de múltiplos folículos ovarianos. À medida que o folículo dominante se desenvolve, ocorre aumento na produção de estradiol (E2) e inibina, que exercem efeito sinérgico de feedback negativo sobre a hipófise, reduzindo a liberação de FSH e prevenindo o recrutamento de novos folículos (Brisko et al., 2011). Durante o diestro, a presença de progesterona (P4) secretada pelo corpo lúteo mantém inibida a liberação de GnRH, impedindo o pico de LH,

mesmo diante de elevados níveis de E2. O feedback positivo do estradiol sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário ocorre apenas na onda folicular ovulatória, após a luteólise, quando a queda da P4 permite que altas concentrações de E2 estimulem a liberação de GnRH e desencadeiem o pico pré-ovulatório de LH, culminando na ovulação (Ginther, et al. 1997).

2.2 Oogênese e foliculogênese

A oogênese tem início ainda durante a vida fetal, quando as células germinativas primordiais, denominadas oogônias, proliferam intensamente por meio de sucessivas divisões mitóticas (Collado Fernandez et al., 2012). Posteriormente, essas células entram na primeira divisão meiótica, originando os oócitos primários, que permanecem em estado de latência na prófase I, também conhecido como estágio de vesícula germinativa (VG), até a puberdade (Bloom; Fawcett, 1994). Com o início da maturidade sexual, os oócitos retomam a meiose, completando a primeira divisão meiótica pouco antes da ovulação. Esse processo culmina em uma citocinese desigual, resultando na formação do oócito secundário, que retém a maior parte do citoplasma, e do primeiro corpúsculo polar. O oócito secundário inicia a segunda divisão meiótica, que permanece interrompida em metáfase II, sendo concluída apenas no momento da fecundação (Junqueira; Carneiro, 2004).

Paralelamente à oogênese, ocorre a foliculogênese, processo pelo qual os folículos ovarianos se desenvolvem desde o estágio primordial até o pré-ovulatório, sendo fundamental para a maturação e viabilidade do oócito (Picton, 2001). Os folículos primordiais são formados ainda na fase fetal e são compostos por um oócito primário envolto por uma única camada de células foliculares achatadas (Junqueira; Carneiro, 2004). Esses folículos representam cerca de 90% da população folicular total presente no ovário (Smitz; Cortvrindt, 2002) A ativação folicular é caracterizada pela transição dessas células para um formato cúbico, dando origem aos folículos primários. À medida que proliferam por mitose, formam múltiplas camadas celulares ao redor do oócito, constituindo as células da granulosa e marcando o desenvolvimento do folículo secundário. Neste estágio, inicia-se a secreção de glicoproteínas responsáveis pela formação da zona pelúcida, uma matriz celular especializada que recobre o oócito (Prestest; Landim- Alvarenga, 2006).

Simultaneamente, as células estromais adjacentes ao folículo em desenvolvimento se diferenciam, originando as camadas da teca, sendo elas interna e externa (Garcia, Fernández, 2012). A teca interna é altamente vascularizada e formada por células endócrinas responsáveis pela produção de andrógenos, que são convertidos em estrógenos pelas células da granulosa, a teca externa é composta por tecido conjuntivo denso e células musculares lisas, atuando na

sustentação do folículo e desempenhando papel importante no processo de ovulação (Magoffin, 2005).

À medida que o folículo adquire um antro central preenchido por fluido folicular, torna-se um folículo antral. Nesse ponto, as células da granulosa passam por especialização funcional e organizacional, formando dois grupos distintos, sendo elas as células da granulosa mural, que revestem a parede interna do folículo e estão envolvidas na sustentação estrutural e síntese hormonal; e as células do cúmulus, que envolvem diretamente o oócito e compõem o COC (Aerts; Bols, 2010). Este complexo exerce papel essencial na aquisição da competência oocitária, por meio de interações bidirecionais que ocorrem através de projeções citoplasmáticas e junções comunicantes. Tais conexões permitem a troca de nutrientes, íons, fatores de crescimento e sinais moleculares, fundamentais para o desenvolvimento coordenado entre as células somáticas e o gameta (Liu et al., 2006).

2.3 Fisiologia da Maturação Oocitária

O oócito amadurece de forma gradual ao longo do desenvolvimento folicular, passando por três formas integradas de maturação, sendo elas a nuclear, citoplasmática e a molecular, cada uma essencial para torná-lo competente à fecundação e ao desenvolvimento embrionário.

2.3.1 Maturação Nuclear

Durante a parada meiótica, que ocorre no estágio de diplóteno da prófase I da meiose, os oócitos de mamíferos apresentam uma reorganização significativa na estrutura da cromatina (Beaumont e Mandl, 1962). Os cromossomos se encontram em um estado mais disperso, em que a cromatina assume a forma de uma rede difusa, na qual os cromossomos são visíveis, mas sem definição (Beaumont e Mandl 1962). Neste estágio, o núcleo dos oócitos é envolto por uma membrana intacta, formando uma estrutura denominada vesícula germinativa (VG). Quando o oócito inicia a retomada da meiose, o material genético sofre um processo de condensação progressiva, e os cromossomos passam a se reorganizar, tornando-se mais visíveis e densamente compactados (Beaumont e Mandl, 1962).

Durante esse período, o oócito permanece envolto por células da granulosa (CG), com as quais estabelece uma comunicação íntima por meio das projeções transzonais (TZPs), extensões das CCs que atravessam a zona pelúcida e fazem contato direto com a membrana do oócito (Buratini et al., 2022). Essa comunicação é reforçada pelo transporte ativo de microvesículas e por mecanismos de sinapse gamética, resultando em uma troca altamente especializada de sinais entre o oócito e seu ambiente folicular. As TZPs contêm junções comunicantes do tipo *gap*, formadas por conexinas, que permitem a passagem de moléculas

sinalizadoras essenciais à regulação meiótica (Albertini et al., 2001). Dentre essas moléculas, destacam-se o AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) e o GMPc (monofosfato cíclico de guanosina), produzidos e liberados pelas CCs (Albertini et al., 2001; Gilchrist et al., 2016). Esses nucleotídeos cíclicos atravessam a zona pelúcida pelas TZPs e atuam diretamente nos sistemas enzimáticos do oócito, mantendo-o em bloqueio meiótico até que estímulos externos promovam sua retomada (Van den Hurk e Zhao 2005).

O AMPc, é um mensageiro químico intracelular que participa da transdução de sinais extracelulares, como hormônios e fatores de crescimento, que ativam receptores de membrana, os quais estimulam a adenilato ciclase (AC). Essa enzima converte ATP (adenosina trifosfato) em AMPc, cuja concentração é regulada pela ação das fosfodiesterases (PDEs) (Richard, 2007). No interior do oócito, níveis elevados e prolongados de AMPc impedem a progressão da meiose, mantendo a célula em estado de repouso. Esse efeito inibitório ocorre por meio da ativação da proteína quinase A (PKA), especialmente sua isoforma do tipo I, responsável por manter o oócito no estágio VG. Já a isoforma do tipo II está relacionada à redução dos níveis de AMPc, permitindo a ruptura da vesícula germinativa e, consequentemente, o reinício da divisão meiótica (Dekel, 2005).

Outro fator importante no processo de manutenção do bloqueio meiótico é o peptídeo natriurético tipo C (NPPC), sintetizado pelas células da granulosa mural e, em menor extensão, pelas células do cúmulo (CCs). A presença de seu receptor, Receptor de Peptídeo Natriurético (do inglês Natriuretic Peptide Receptor 2) (NPR2), localizado principalmente nas CCs, permite que o NPPC se ligue e ative esse receptor, desencadeando a síntese de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Vaccari et al., 2009; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011; Shuhaibar et al., 2016; Dellaqua et al., 2023).O NPPC atua como inibidor fisiológico da retomada da meiose (Soares et al., 2017), uma vez que altos níveis de GMPc inibem a atividade da fosfodiesterase tipo 3 (PDE3A) sobre o AMPc. Com isso, a integridade do AMPc no oócito é preservada, mantendo-o em um estado de pausa meiótica (Tsafriri et al., 1996; Franciosi et al., 2014; Soares et al., 2017). Em contrapartida, quando ocorre a redução dos níveis de GMPc no oócito, aumenta a atividade da PDE3A sobre o AMPc, reduzindo seus níveis e, assim, estimulando a retomada da meiose (Conti et al., 2012; Clarke, 2018).

A membrana que estava intacta protegendo o núcleo dos oócitos se desintegra em um processo chamado de quebra da vesícula germinativa (VGBD) (Pincus, Enzmann, 1935). Permitindo que o conteúdo nuclear se reorganize, preparando o oócito para avançar para as fases seguintes da divisão meiótica (Coticchio et al. 2013). Para oócitos equinos foram propostos três estágios principais de configuração do material genético quando ainda localizado

na VG, de acordo com o grau de condensação da cromatina. Primeiramente, na configuração fibrilar, a cromatina aparece dispersa, com filamentos finos e pouco condensados. Em seguida, na configuração intermediária, a cromatina começa a se aglomerar, formando um único agregado mais compacto, embora ainda não completamente condensado. E na configuração condensada, onde a cromatina está completamente compactada, formando um aglomerado denso (Hinrichs et al., 1993).

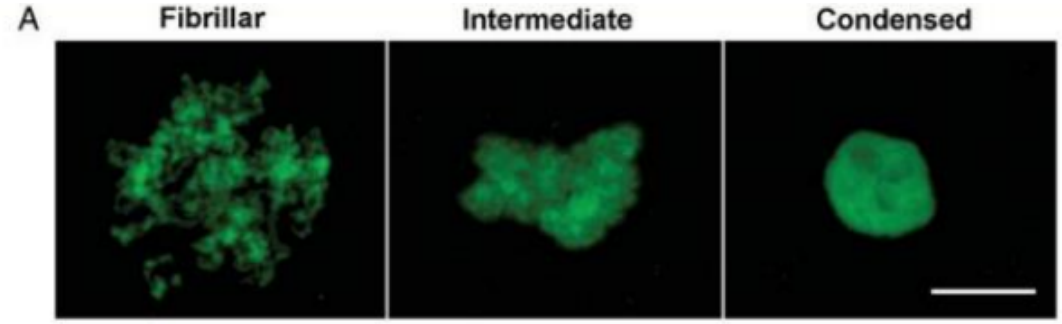


Figura 1: Imagens representativas da configuração da cromatina fibrilar, intermediária e condensada no estágio VG. Fonte: Franciosi et al 2012

Durante esse processo de maturação nuclear, o oócito completa a meiose I, passando de diplóide para haplóide, e avança para a metafáse II (MII). Uma vez que o oócito atinge essa fase, a entrada do espermatozoide completa a meiose, que resulta na formação do segundo corpúsculo polar e a fusão dos pronúcleos do espermatozoide e do oócito (Pincus and Enzmann 1935). As junções comunicantes e as projeções transzonais das células do cúmulo para o oócito são rompidas durante os estágios finais da maturação do oócito (Turathum et al., 2021).

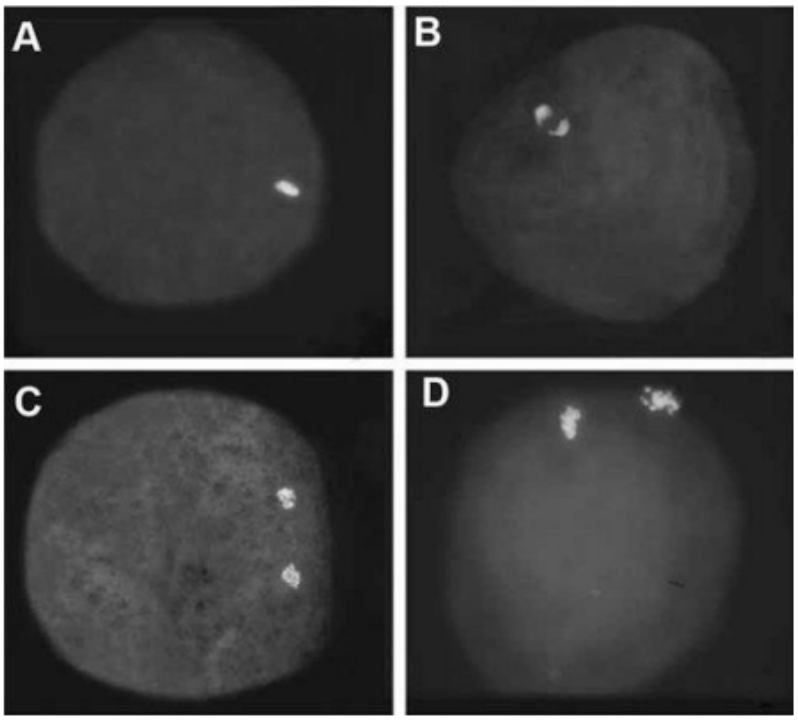


Figura 2. Oócitos equinos corados com Hoechst 33258. A: Metáfase I, (B) anáfase I, (C) telófase I e (D) metáfase II. Fonte: KATRIN HINRICHS, 2010.

2.3.2 Maturação Citoplasmática

Durante a maturação oocitária, ocorrem também alterações citoplasmáticas essenciais para a competência do oócito, entre essas mudanças está o rearranjo e redistribuição das organelas no citoplasma (Lonergan and Fair, 2016). Essas mudanças fazem parte de um processo conhecido como maturação citoplasmática que envolve a modificação de proteínas e a reorganização das estruturas subcelulares, sendo necessárias para assegurar que o oócito possua a competência celular necessária para sustentar as primeiras divisões embrionárias e o desenvolvimento pós-fecundação (Hyttel et al., 1997). O reposicionamento das mitocôndrias no oócito é essencial, pois essas organelas produzem ATP, a fonte de energia crucial para sustentar os processos metabólicos e divisionais nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário (Cibelli et al., 2008). Durante a maturação dos oócitos de mamíferos, a distribuição mitocondrial apresenta um padrão bem definido. No estágio de VG, as mitocôndrias localizam-se predominantemente na periferia do citoplasma, enquanto nos oócitos em MII, as mitocôndrias ocupam uma posição mais centralizada no citoplasma (Hyttel et al., 1997; Sun et al., 2001; Adona et al., 2008). Outro componente importante do citoplasma são os grânulos corticais (GC), vesículas secretoras não renováveis. Os GC são compostos por

moléculas como proteases, glicosidases, enzimas e proteínas estruturais, que contribuem para a modificação da matriz extracelular (zona pelúcida), criando uma barreira física e bioquímica que impede a polispermia (Wessel et al., 2001). A sua migração para a periferia do oócito ocorre durante o avanço da maturação. Quando o oócito atinge o estágio de MII, os GC estão distribuídos no córtex, próximos à membrana plasmática (Fig. 3; Wessel et al., 2001; Velilla et al., 2004; Adona et al., 2008). Nessa fase, destaca-se a atuação do citoplasma, responsável por fornecer suporte metabólico e armazenar moléculas essenciais para o desenvolvimento futuro (Gilchrist et al., 2008).

Durante o processo de maturação final, os oócitos passam por alterações citoplasmáticas significativas, destacando-se entre elas o acúmulo de gotículas lipídicas, compostas principalmente por triglicerídeos (Hyttel et al., 2010). Nos estágios iniciais, como o de vesícula germinativa, o citoplasma apresenta-se claro e homogêneo. No entanto, à medida que o oócito equino progride para a maturação meiótica, ocorre a concentração de lipídios em regiões específicas do citoplasma, tornando-o visualmente mais denso, opaco e com coloração mais escura (Lewis et al., 2016; Bertero et al., 2017). Segundo Hyttel, essa tonalidade escurecida do citoplasma é considerada um marcador morfológico frequentemente associado à competência oocitária, sendo que oócitos com citoplasma escuro e granular tendem a apresentar maior viabilidade para o desenvolvimento embrionário.

2.3.3 Maturação Molecular

Por fim, a maturação molecular representa uma etapa crítica e altamente regulada da maturação oocitária, sendo essencial para que o oócito alcance plena competência para a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial (Piccioni et al., 2005). A maturação molecular compreende um conjunto coordenado de eventos bioquímicos, entre os quais se destacam a transcrição, o armazenamento e o processamento de mRNAs, que serão posteriormente traduzidos em proteínas fundamentais e nos eventos subsequentes, tais como fecundação, formação dos pronúcleos e fase inicial da embriogênese (Silva, 2008).

Durante a fase de crescimento folicular, os oócitos acumulam transcritos maternos que permanecem inativos no citoplasma, frequentemente em formas com caudas poli-A curtas, o que os caracteriza como funcionalmente silenciosos (Gandolfi; Gandolfi, 2001). A transcrição e o acúmulo desses mRNAs ocorrem enquanto o núcleo oocitário está em quiescência meiótica, ou seja, em prófase I, período no qual a cromatina se apresenta descondensada e transcricionalmente ativa (Sirard et al., 2006). No entanto, com a retomada da meiose e a

condensação cromossômica, a atividade transcripcional é cessada, e os mRNAs estocados passam a ser seletivamente degradados ou ativados, conforme a necessidade celular (Lin, 2010).

A ativação desses mRNAs armazenados ocorre por meio de sinais moleculares específicos que promovem a poliadenilação citoplasmática, processo no qual há adição de adeninas à extremidade 3' das moléculas de mRNA, realizada pela enzima poli-A polimerase. Este evento promove a liberação de fatores inibitórios da extremidade 5', permitindo o início da tradução (Tomek; Torner; Kanitz, 2002). Com isso, inicia-se a síntese de proteínas cruciais para a montagem do fuso meiótico, a manutenção do bloqueio na metáfase II, a fecundação e a formação dos pronúcleos (Silva, 2008; Lin, 2010).

No estágio de VG, embora o oócito contenha uma grande quantidade de mRNA materno, a taxa de tradução é relativamente baixa. Esta capacidade de síntese proteica, entretanto, se mantém ativa ao longo de toda a maturação e do desenvolvimento inicial do embrião, sendo modulada por mecanismos pós-transcricionais finamente ajustados (Gandolfi; Gandolfi, 2001). Assim, a eficiência com que o oócito armazena, protege e reativa esses mRNAs, por meio da poliadenilação controlada, é determinante para sua competência em sustentar os eventos iniciais da embriogênese (Sandri, 2007).

Segundo Wehrend e Meinecke (2001), a retomada da meiose e o processo de maturação são regulados pela fosforilação e desfosforilação proteica, mediadas pelas proteínas quinases e fosfatases, respectivamente. E algumas moléculas que estão envolvidas no bloqueio e reinício meiótico. O bloqueio prolongado dos oócitos no estágio de prófase I e a subsequente retomada da meiose estão correlacionados com mudanças na concentração intraoocitária de cAMP (Kawamura et al. 2004). No entanto, esta não é a única molécula envolvida nestes processos. Outra molécula fundamental na regulação da maturação oocitária é a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK1 e 2), que pertence à família das quinases serina-treonina, também conhecidas como quinases reguladas por sinal extracelular (ERK2 e 3) (CAMPBELL et al., 1995). Essas proteínas desempenham papéis essenciais no reinício e progressão da maturação nuclear, na reorganização dos microtúbulos e na formação do fuso meiótico, além de contribuir para a manutenção do oócito no estágio de metáfase II (MII) e para a expansão das células do cumulus (SU et al., 2003) quando ativada, a MAPK promove a ativação e estabilização do fator promotor da maturação (MPF) nos oócitos. A ativação da MAPK nas células do cumulus também depende dos fatores parácrinos secretados pelo oócito, o que demonstra a capacidade do oócito em controlar sua própria maturação meiótica (YAMADA; ISAJI, 2011).

2.3 Pré- Maturação e Maturação *in vitro*

Ao serem removidos do ambiente folicular, os COCs perdem rapidamente os sinais inibitórios da meiose presentes no fluido folicular, o que resulta na retomada espontânea da meiose (Gilchrist, 2011). Essa retomada prematura, na ausência de uma regulação adequada, pode comprometer a competência oocitária, pois não há tempo suficiente para que o oócito complete os eventos moleculares e citoplasmáticos essenciais à sua maturação plena. Nesse contexto, estratégias de pré-MIV têm sido propostas, buscando preservar o bloqueio meiótico temporariamente, prolongando e permitindo uma sincronização mais eficiente entre a maturação nuclear, citoplasmática e molecular (Gilchrist e Thompson, 2007). Essa coordenação mais próxima das condições *in vivo* contribui significativamente para o desenvolvimento de oócitos mais competentes, com maior potencial de fecundação e desenvolvimento embrionário (Krisher et al., 2004). Isso porque a maturação nuclear isolada não é suficiente para assegurar o sucesso do desenvolvimento embrionário subsequente, sendo necessária uma maturação citoplasmática e molecular adequadamente sincronizada (Kubelka et al., 2000; Mermillod et al., 2000).

A interrupção da progressão meiótica no estágio de diplóteno da prófase I, caracterizado pela presença da VG no oócito, tem se mostrado uma estratégia promissora para aprimorar a qualidade dos oócitos destinados à MIV (Adona et al., 2008). Essa pausa fisiológica permite que os oócitos sejam mantidos temporariamente, sincronizando sua maturação com o momento ideal da maturação. Esse alinhamento é regulado por sinais hormonais, como o aumento dos níveis de LH, que induzem a retomada da meiose, permitindo que a maturação e a ovulação ocorram no tempo adequado (Coticchio et al., 2013; Beaumont & Mandl, 1962).

As tecnologias na indústria de reprodução assistida têm registrado um crescimento significativo, com avanços notáveis em técnicas de coleta e manipulação de oócitos imaturos. Estas técnicas possibilitam que oócitos sejam enviados para outros locais, onde a ICSI é realizada (Carnevale, 2016). O controle da temperatura é a técnica mais utilizada em equinos para manter o oócito em seu estado imaturo. A redução da temperatura tem um efeito direto sobre a atividade metabólica do oócito, causando desaceleração da progressão da meiose. Em temperaturas mais baixas, a atividade de várias enzimas envolvidas nos processos celulares diminui, incluindo aquelas que promovem a divisão celular e o amadurecimento do oócito (Dini et al. 2021). Esse efeito ocorre porque a maioria das enzimas é sensível a mudanças de temperatura. Este tratamento, chamado de *Holding*, conserva a estrutura em meio tamponado sem inibidores de maturação em temperatura ambiente entre 22°C a 27°C (Choi et al., 2006). Pesquisas apontam que a exposição à temperatura ambiente não causa efeitos adversos, mas

não há estudos que sugiram um benefício dessa estratégia para a otimização da competência oocitária (revisado por Hinrichs, 2018).

Uma abordagem comum consiste no uso de substâncias conhecidas como bloqueadores meióticos, que interrompem a progressão da meiose. Por exemplo, em estudos com bovinos, a butirolactona I, um potente inibidor das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), tem sido utilizada para bloquear o rompimento da VG. Além disso, a butirolactona I apresenta poucos efeitos inibitórios sobre outras quinases, como a MAPK, o que a torna uma ferramenta eficaz para o controle da maturação nuclear (Kubelka et al., 2000). Outra alternativa já testada em oócitos bovinos é o uso de roscovitina, uma substância derivada da purina, conhecida por ser um potente inibidor da ativação da quinase que forma o fator promotor da maturação, impedindo a maturação nuclear (Ponderato et al., 2002). Além disso, os inibidores PDE são substâncias que agem impedindo a degradação do AMPc, assim contribuindo para a manutenção da parada meiótica. As PDE são enzimas que degradam o AMPc, reduzindo seus níveis dentro da célula. Quando se utilizam inibidores de PDE, como a milrinona, essa degradação é bloqueada, permitindo que o AMPc se acumule no oócito (Zhang et al., 2011). Esse acúmulo de AMPc é essencial, pois ativa a enzima PKA, que, por sua vez, desencadeia uma cascata de reações bioquímicas que impedem a progressão da meiose (Gilchrist et al., 2016). A cilostamida, um inibidor específico da PDE3, tem sido utilizada em protocolos de pré-maturação para modular a maturação nuclear dos oócitos. Um estudo em equinos, que utilizou a pré-maturação por 6 horas com cilostamida sugere que essa abordagem pode favorecer a maturação citoplasmática de um subconjunto de oócitos equinos ainda em fase inicial de maturação, melhorando sua competência para a maturação *in vitro*, de forma semelhante ao observado em outras espécies de mamíferos (Lodde et al., 2019).

Outro fator com participação importante na manutenção do bloqueio meiótico é o peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), reconhecido inicialmente como um inibidor fisiológico da retomada da meiose em camundongos (Zhang et al., 2010). Em bovinos, estudos demonstraram que sistemas de cultivo com adição de NPPC retardam a retomada da meiose, sendo capazes de prolongar a comunicação oócito-cúmulo e manter os oócitos em estágio de VG por mais tempo (Franciosi et al., 2014; Soares et al., 2017). Além disso, um estudo recente também utilizou o NPPC como estratégia de pré-MIV na espécie equina, reforçando seu potencial fisiológico como regulador do bloqueio meiótico (Fakhar et al.,2025). Por outro lado, fármacos sintéticos, como inibidores de fosfodiesterases ou quinases, podem ser usados em modelos experimentais para induzir ou bloquear a meiose. Embora úteis para estudar o comportamento da meiose, esses fármacos não mimetizam os processos fisiológicos naturais.

Em contraste, o NPPC é uma molécula que regula fisiologicamente a retomada da meiose (Soares et al., 2017).

No entanto, a maioria dos estudos sobre bloqueadores meióticos foi conduzida em modelos murinos ou bovinos, havendo uma escassez significativa de dados específicos em equinos. Essa lacuna evidencia a necessidade de investigações direcionadas para as particularidades fisiológicas da maturação oocitária em éguas. A limitada quantidade de pesquisas nessa área representa não apenas um desafio, mas também uma oportunidade para avanços científicos, destacando a importância de aprofundar o conhecimento sobre o controle da maturação nuclear nessa espécie. Nesse contexto, o NPPC surge como um agente promissor para estudos do controle da maturação oocitária em éguas, por refletir mecanismos biológicos endógenos característicos dessa espécie.

3 Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHOI YH, LOVE LB, VARNER DD, HINRICHS K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology** 2006;66: 955-963.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LODDE V, COLLEONI S, TESSARO I, CORBANI D, LAZZARI G, LUCIANO AM, GALLI C, FRANCIOSI F. A prematuration approach to equine IVM: considering cumulus morphology, seasonality, follicle of origin, gap junction coupling and large-scale chromatin configuration in the germinal vesicle. **Reprod Fertil Dev** 2019;31: 1793-1804.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

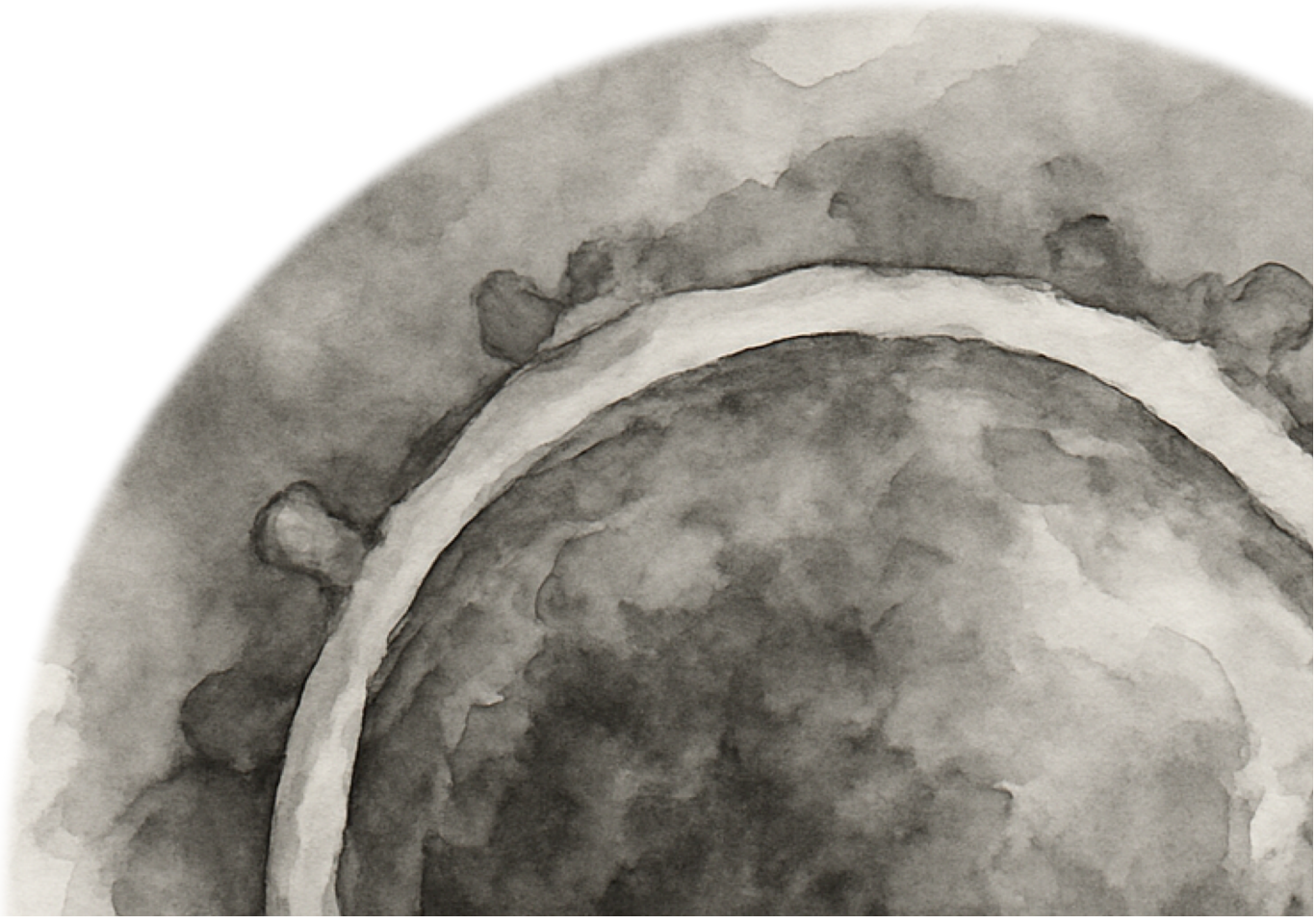
YAMADA M, ISAJI Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reprod Med Biol**. 2011;10:69-79.

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

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

CAPÍTULO 2

Influence of C-type Natriuretic Peptide on Meiotic Progression During In Vitro Maturation of Equine Oocytes



Influence of C-type Natriuretic Peptide on Meiotic Progression During In Vitro Maturation of Equine Oocytes

Mariana D. Esposti 1*, Ana C. S. Soares, Nathalia R. Silva, José Buratini Junior

Ovarian Molecular Physiology Laboratory, Department of Physiology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, Botucatu, Brasil.

In Vitro Equinos LTDA, Mogi mirim, Brasil

Correspondence:

Mariana Degli Esposti

Department of Physiology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University

Rubião Junior, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970

Telephone/Fax: (55) 14.38800330

E-mail: mariana.esposti@unesp.br

ABSTRACT

Pre-in vitro maturation (pre-IVM) is a strategy used to delay the nuclear maturation of oocytes, maintaining them at the germinal vesicle (GV) stage until cytoplasmic and molecular maturation processes are complete. C-type natriuretic peptide (NPPC) acts as a physiological blocker of meiotic resumption by increasing cGMP levels in cumulus cells, thereby preserving the oocyte at the GV stage. This study aimed to evaluate different concentrations of NPPC in pre-IVM protocols of equine oocytes in order to identify the most effective dose to maintain meiotic arrest without compromising competence for subsequent maturation. Three independent experiments were conducted. Oocytes collected by transvaginal follicle aspiration or ovum pick-up (OPU) were randomly assigned to experimental groups. In the first experiment, increasing concentrations of NPPC (0, 50, and 100 nM) were tested in DMEM-F12 medium at 38.5°C, with nuclear stage evaluated after 10 hours of culture. The second experiment investigated higher doses (0, 100, and 200 nM) under the same conditions. Based on the results from the first two experiments, the third evaluated the prolonged effect of NPPC at 100 nM (N100) for 20 hours, comparing its effect to that of a commercially used holding medium maintained at 22°C. Analysis of meiotic stages revealed that the 100 nM concentration of NPPC resulted in the lowest proportion of oocytes at advanced meiotic stages, with only 4.7% and 7.2% in the first two experiments, compared to 11.8% in the control group without NPPC. Moreover, NPPC prolonged meiotic arrest during pre-IVM in the third experiment. The results indicate that the use of NPPC in equine pre-IVM represents a promising, physiologically relevant, and potentially applicable approach to optimize in vitro maturation protocols, especially in situations requiring prolonged transport or manipulation of cumulus-oocyte complexes (COCs).

Keywords: Pre-in vitro maturation, NPPC, Germinal vesicle and Equine oocytes

1 Introduction

The increasing demand for high-performance animals in the equine industry has significantly promoted the use of reproductive biotechnologies. There is a growing interest in both research and commercial application of these techniques, especially in the *in vitro* production of embryos [1]. However, the application of these biotechnologies faces certain limitations, particularly due to the specific characteristics of the mare's reproductive physiology. As in all monovulatory species, mares typically develop only one, or occasionally two, dominant follicles per estrous cycle [2]. The main goal of developing these techniques is to overcome the natural limitations of equine reproduction, thereby enhancing both productivity and genetic efficiency. *In vitro* maturation (IVM) of oocytes is a well-established strategy and represents a crucial step for the success of equine *in vitro* embryo production [3], playing a fundamental role in maximizing genetic potential and preserving economically valuable breeds. In addition to physiological factors, the logistics involved in applying reproductive biotechnologies in equines pose further challenges, particularly due to the geographical distance between oocyte collection sites and specialized laboratories. In this context, the use of specific medium for transporting cumulus-oocyte complexes (COCs) has become essential to preserve their viability and quality until the beginning of IVM.

Meiotic resumption occurs spontaneously after removal of COCs from the follicle, as they rapidly lose the inhibitory signals present in the follicular fluid [4]. This spontaneous resumption results in asynchrony between the three main maturation events in the oocyte: nuclear, cytoplasmic, and molecular, all essential for the acquisition of fertilization competence and embryonic development. Premature meiotic resumption, in the absence of adequate regulatory mechanisms, can compromise oocyte quality due to insufficient time for the completion of critical molecular and cytoplasmic processes [5]. In this context, strategies such as pre-*in vitro* maturation(pre-IVM) have been developed to temporarily preserve meiotic arrest, thus allowing more efficient synchronization of nuclear, cytoplasmic, and molecular maturation.

Temperature control is the most commonly used technique in horses to maintain oocytes in their immature state. Temperature reduction decreases oocyte metabolic activity, delaying meiotic progression as a result of the overall reduction in enzyme activity [6], since most enzymes are temperature-sensitive. This method, known as "holding," preserves COCs in a buffered medium without maturation inhibitors at room temperature, typically between

22°C and 27°C [7]. Studies indicate that exposure to room temperature does not produce adverse effects; however, there is no evidence that this strategy benefits oocyte competence [8].

In contrast, the mechanism of meiotic arrest *in vivo* occurs differently. The oocyte remains surrounded by granulosa cells, with which it maintains close communication through transzonal projections (TZPs), extensions of the cumulus cells that cross the zona pellucida and make direct contact with the oocyte membrane [9]. The maintenance of meiotic arrest is largely modulated by the NPPC/NPR2/cGMP system. NPPC, produced mainly by mural granulosa cells, binds to its receptor NPR2 [11], expressed in the cumulus cells. NPR2 activation stimulates the production of cGMP in cumulus cells, which is transferred to the oocyte through TZPs. This continuous supply maintains high concentrations of cGMP in the oocyte, inhibiting phosphodiesterase 3A (PDE3A) and preventing the degradation of Adenosine monofosfato cíclic (cAMP) [12,13]. Elevated cAMP levels keep protein kinase A (PKA) active, blocking the activation of cascades that would trigger meiotic resumption. This mechanism persists until the preovulatory LH surge reduces NPPC/NPR2 signaling, causing a decrease in cGMP and cAMP levels and allowing the oocyte to resume meiotic progression [14].

In this context, NPPC supplementation in pre-IVM protocols has emerged as a promising strategy to mimic the *in vivo* follicular environment, prolonging meiotic arrest and promoting better synchronization of nuclear, cytoplasmic, and molecular maturation [15,16]. Its inhibitory effect is reversible, allowing the active resumption of meiosis after transfer to the IVM medium [17,18], without long-term adverse effects, unlike pharmacological approaches such as PDE3 inhibitors, including cilostamide and milrinone, which maintain meiotic arrest by preventing cAMP degradation [19,20].

Oocytes destined for IVM are collected from follicles at different stages of development, presenting variation in chromatin configurations at the germinal vesicle (GV) stage. These differences, associated with the timing of germinal vesicle breakdown (GVBD) [21], are influenced by follicle size and the stage of the follicular wave, impacting oocyte and cumulus cell morphology as well as the oocyte's embryonic developmental potential [22]. To better characterize this variation, studies in equine oocytes describe three main chromatin configurations during the GV stage, classified according to the degree of condensation [23]. In the fibrillar stage, chromatin appears dispersed with thin filaments; in the intermediate stage, partial aggregation begins; and in the condensed configuration, chromatin is fully compacted into a single well-defined aggregate [24].

Given the importance of synchronizing nuclear, cytoplasmic, and molecular events during oocyte maturation to achieve full developmental competence, this study aimed to assess a new holding protocol for equine oocytes based on supplementation with NPPC, a key physiological regulator of meiosis. We first assessed NPPC activity in the equine COC in dose-response experiments, after which the efficacy of the new protocol in holding oocyte nuclear maturation was assessed using the conventional low-temperature holding model as the comparative parameter.

2 Materials and methods

The experiments were conducted using mares belonging to IN VITRO Equinos, a commercial equine breeding center located at Fazenda São Francisco (Vicinal 021, Rodovia Amador Jorge da Siqueira Franco, s/n, Bairro Soares, Mogi Mirim, SP, Brazil). Healthy mares, aged 4 to 14 years and weighing between 400 and 600 kg, without reproductive abnormalities or clinical problems, were randomly selected for the study. All animals had a normal reproductive history and were managed under routine commercial conditions, including standardized feeding protocols and daily handling. The care, management, and monitoring of the animals were performed exclusively by the company's technical team. It should be noted that only follicular cells were used in the experiments, the collection of which was carried out under the company's responsibility, without any detriment to the health or well-being of the animals involved.

2.1 Transvaginal follicle aspiration or ovum pick-up

Transvaginal follicular aspiration (OPU) was performed on random estrus days without animal synchronization to retrieve immature oocytes from visible antral follicles in donor mares, as described by Cuervo-Arango et al. (2025). During the procedure, the ovaries were held in position by transrectal palpation, securing them against the vaginal wall while the aspiration needle was inserted transvaginally. All visible antral follicles were aspirated using an aspiration and lavage pump specifically designed for equine OPU, which allows simultaneous control of the infusion. Follicular lavage was performed with sterile heparinized medium (PBS with 10 IU/mL heparin) using manual injection with a plastic syringe without a rubber plunger. The volume of medium per follicle ranged from 0.5 to 3 mL, depending on the follicular diameter. The aspirated oocytes were collected and kept at 38°C, filtered in an embryo collection filter (WTA) and subsequently transferred to selection medium for morphological evaluation and allocation into experimental groups.

2.2 Experimental design

The first phase of this study, we evaluated the effects of different concentrations of NPPC during the pre-IVM phase of equine oocytes. Experiments 1 and 2 were conducted with at least three biological replicates each, with an average of 10 COCs per experimental group, recovered via OPU. COCs were cultured in DMEM-F12 base maturation medium, as described by Lazzari et al. (2020) [25]. In the first experiment, the experimental groups were distributed as follows: Time zero (0 hour), N0 (DMEM-F12 medium without addition of NPPC), N50 (DMEM-F12 medium with 50 nM NPPC), and N100 (DMEM-F12 medium with 100 nM NPPC). After washing, the collected oocytes were pooled and randomly allocated among the experimental groups, since the mares were not synchronized and OPU was performed on random days of the estrous cycle. For the Time zero group, after division into experimental groups, the oocytes were immediately denuded and fixed to assess their post-OPU stage. The COCs from the other groups were stored in 2 mL cryovials containing a layer of mineral oil, equilibrated with a gas mixture (5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2), properly sealed, and transported to the laboratory at 38.5°C. Upon arrival, the tubes were opened, and the COCs were incubated at a controlled temperature and atmosphere for 10 hours of culture. After this period, the complexes were denuded, fixed, permeabilized, and stained with Hoechst 33342 for chromatin analysis, verification of the presence or absence of GV and classification of oocytes according to chromatin configuration.

Considering the results obtained in Experiment 1 (see Results), Experiment 2 was designed to evaluate a higher concentration of NPPC. The groups were: N0 (DMEM-F12 medium without NPPC), N100 (DMEM-F12 medium with 100 nM NPPC), and N200 (DMEM-F12 medium with 200 nM NPPC). The culture and evaluation procedures were performed as previously described.

In the third experiment, based on the results of the first two experiments, the NPPC concentration that performed best in maintaining the GV stage was selected for comparison with the conventional retention medium commonly used for commercial COC transport. The NPPC-treated group was cultured as previously described: COCs were placed in 2 mL cryovials containing 400 μL of DMEM-F12 medium supplemented with the selected concentration of NPPC, covered with sterile mineral oil, equilibrated with a gas mixture of 5% CO_2 , 5% O_2 , and 90% N_2 , and transported in a dry bath at 38.5°C to the laboratory. Upon arrival, the tubes were incubated with the lids open at 38.5°C under a controlled atmosphere for 20 hours. In the control group, oocytes were placed in cryovials containing 1 mL of Holding

187 medium (a buffered transport medium without maturation inhibitors) and kept at room
188 temperature (between 22°C and 27°C) for 20 hours. After the incubation period, oocytes from
189 both groups were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes and permeabilized with Triton
190 X-100 for 15 minutes.

191 **2.3 Assessment of GV chromatin status**

192 In equine oocytes, three main chromatin configurations have been described while still
193 at the GV stage, based on the degree of chromatin condensation [23]. The first, known as the
194 fibrillar configuration, is characterized by diffusely distributed chromatin within the nucleus,
195 appearing as fine and loosely organized filaments. Next, in the intermediate configuration,
196 chromatin begins to condense, forming a single denser aggregate, although not yet fully
197 compacted. Finally, in the condensed configuration, chromatin is completely compacted into a
198 single dense and spherical mass, suggesting increased meiotic competence of the oocyte [24].

199 After fixation in paraformaldehyde and storage, oocytes were subjected to three 10-
200 minute washes, followed by incubation for 30 minutes in Hoechst 33342 solution (H3570,
201 Invitrogen) at 10 µg/mL, and concluded with a 20-minute wash. In the first two experiments,
202 only the genetic material was stained, and the GV stage was analyzed using an epifluorescence
203 microscope. In the third experiment, both the GV and the genetic material were stained. The
204 oocytes were then mounted on glass slides in 20 µL of ProLong Gold Antifade Mountant
205 (P10144, Invitrogen) and covered with coverslips. Images were acquired using a 63× objective
206 on a Leica DMi8 inverted fluorescence microscope with a Thunder imaging system, with
207 excitation/emission wavelengths of 488/496 nm for AF 488 and 352/454 nm for Hoechst 33342
208 [26].

209 **2.4 Statistical analysis**

210 In all experiments, each cow represents one replicate. Data in the form of percentages
211 were arcsine transformed. Shapiro-Wilk's test was used to verify normality. When data were
212 parametric, groups were compared with the Student's *t* test, while nonparametric data were
213 compared with the Kruskal-Wallis test. All analyses were performed using the JMP software
214 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and differences were considered significant at two-sided
215 $P<0.05$. Values of $P \leq 0.1$ and > 0.05 were considered to indicate a tendency of difference.

216

3 Results

3.1 Impact of increasing NPPC concentrations on nuclear maturation dynamics during 10 hours of pre-IVM of equine oocytes

In the first experiment, the results observed in the fibrillar GV stage were as follows: 4.7% (1/15) of oocytes in the N0 group, 28.3% (6/22) in N50, 40.83% (7/21) in N100, and 75% (5/8) in the 0 hour group. For the intermediate GV stage, the percentages were 42.8% (6/15) in N0, 44.4% (9/22) in N50, 42.2% (9/21) in N100, and 8.3% (1/8) in the 0 hour group. Regarding the condensed GV stage, 35.7% (6/15) of oocytes were in N0, 18.9% (4/22) in N50, 13.8% (4/21) in N100, and 8.3% (1/8) in the 0 hour group (**Fig. 1**). Chromatin degeneration was observed in 8.3% (1/15) and 5.5% (2/22) of oocytes in the N0 and N50 groups, respectively, while it was absent in N100 and 0 hour. Additionally, oocytes in more advanced meiotic stages, without GV, were found in 8.3% (1/15), 2.7% (1/22), and 8.3% (1/8) of oocytes in the N0, N50, and 0 hour groups, respectively. The N100 group did not present any oocytes in advanced meiotic stages (**Fig. 2**). Analysis of GV stage distribution revealed no statistically significant differences among experimental groups ($p > 0.05$). The 0 hour group served only as a reference point at the start of the experiment and was excluded from statistical analysis.

In the second experiment, where the increase in NPPC dose was tested, no significant differences were observed among groups for the fibrillar GV stage (N0 = 25.8% [9/35]; N100 = 16% [6/39]; N200 = 42.9% [23/39]), intermediate GV (N0 = 23% [8/35]; N100 = 41.8% [16/39]; N200 = 28% [16/39]), or condensed GV (N0 = 35.8% [13/35]; N100 = 37.3% [15/39]; N200 = 21% [11/39]) ($p > 0.05$ for all comparisons; **Fig. 3**). Chromatin degeneration was detected in 2.2% (1/39) of oocytes in the N100 group and 1.8% (1/39) in N200, while no degeneration was observed in N0. Furthermore, oocytes in more advanced meiotic stages, without GV, accounted for 11.8% (4/35) in N0, 4.7% (2/39) in N100, and 7.2% (3/39) in N200, with no statistical differences between groups ($p > 0.05$; **Fig. 4**).

3.2 Comparative Analysis of NPPC Supplementation and *Holding* Medium on Oocyte Meiotic Arrest after 20 hours of pre-IVM

Given the results of the first two experiments, the 100 dose was chosen for this comparison. The results obtained for the GV stage were as follows: 74% (38/52) of the oocytes in the N100 group and 89% (40/45) in the Holding group remained in the GV stage. Regarding meiotic resumption (GVBD + MI + MII), 26% (14/52) of the oocytes in the N100 group and 11% (5/45) in the Holding group progressed to more advanced stages (**Fig. 6**). Regarding chromatin configuration, the proportion of oocytes in the GV fibrillar stage was 42.7% (20/52) in the

N100 group and 17.2% (8/45) in the Holding group. For the intermediate GV configuration, the observed percentages were 18% (10/52) in the N100 group and 16% (12/45) in the Holding group. For the condensed configuration, they were 9% (5/52) in the N100 group and 48% (19/45) in the Holding group (**Fig. 5**). The analysis of the variables revealed significant differences between the N100 and Holding groups for the fibrillar and condensed GV stages. The proportion of oocytes at the fibrillar GV stage was higher in the N100 group compared to Holding ($p = 0.0265$), whereas the Holding group showed a higher proportion of condensed GV compared to N100 ($p = 0.0169$). No differences were observed between groups for the intermediate GV stage ($p > 0.9999$).

4 Discussion

During the estrous cycle, physiological changes in the follicular microenvironment directly influence oocyte maturation, impacting its developmental potential. Considering this dynamic, the present study evaluated pre-IVM strategies in equine oocytes using NPPC supplementation at physiological temperature (38.5°C) to prolong viability and preserve oocyte competence during transport and manipulation. The results demonstrated that NPPC consistently delayed meiotic progression, favoring the maintenance of earlier chromatin stages and reducing the proportion of oocytes in advanced phases compared to the traditional Holding method. These findings reinforce the potential of NPPC as a physiological meiotic blocker alternative to temperature reduction, with additional benefits for preserving nuclear quality.

In the first experiment, the modulatory effect of NPPC on meiotic progression was assessed when added alone to a commercial culture medium (DMEM-F12) maintained at 38.5°C, using chromatin morphology within the GV as a parameter of nuclear competence and meiotic stability (**Fig 1**). The results showed that, as previously described in other species [33, 36], NPPC was able to reduce the rate of chromatin maturation and condensation, suggesting a protective effect on nuclear structure. After 10 hours of culture, it was observed that the concentration of 100 nM promoted a trend towards an increased proportion of oocytes in fibrillar GV (40.8%) compared to the control group without NPPC (N0 4.7%), approaching the profile observed in the 0 hour group (75%), representative of the basal state before culture. Furthermore, the distribution of intermediate and condensed GV patterns was more balanced in the NPPC-supplemented groups compared to the control, and only the N100 group showed a complete absence of oocytes in advanced meiotic stages (GVBD), which were detected in the N0 (8.3%), N50 (2.7%), and 0 hour (8.3%) groups. The presence of degenerated chromatin

was restricted to the N0 (8.3%) and N50 (5.5%) groups, reinforcing a possible protective action of NPPC at higher concentrations.

In experiment 2, when comparing the N0, N100, and N200 concentrations, no significant differences were observed in the total proportion of oocytes in GV ($p = 0.3381$), although the N0 group showed a numerical trend towards greater meiotic advancement. Analysis of GV subtypes revealed a significant difference only in the fibrillar pattern ($p = 0.0428$), more frequent in the N200 group, while N100 showed a trend for higher frequency in the intermediate pattern. These findings reinforce that NPPC mainly acts to maintain the nuclear stage existing at the time of collection, without reversing maturation.

Supplementation with different NPPC concentrations indicated a dose-dependent effect on maintaining nuclear immaturity, with the 100 nM concentration showing promising results, motivating its selection for subsequent tests. In the final experiment, which compared treatment with 100 nM NPPC to the traditional low-temperature retention method (Holding), it was found that the proportion of oocytes maintained in GV was numerically higher in Holding (89%) than in NPPC (74%), with no statistical difference ($p = 0.3000$) (**Fig. 6**). However, when analyzing the fibrillar GV stage, the NPPC group presented a higher percentage (42.7%) compared to Holding (17.2%), along with a lower proportion of oocytes with condensed chromatin (9.3% vs. 48.1%) after 20 h of incubation (Fig. 5). These data suggest that NPPC, unlike simple temperature reduction, favors preservation of earlier chromatin patterns, potentially beneficial for oocyte competence.

Maintenance of meiotic arrest at the diplotene stage is essential to preserve chromatin in a less condensed state and ensure membrane integrity [34], critical factors for prolonged oocyte transport, especially when donors are geographically distant from the IVM laboratory. In this sense, the ability of NPPC to reproduce natural follicular physiological mechanisms represents a relevant advantage over methods based solely on temperature reduction, which act in a generalized manner and may compromise oocyte quality [11, 32, 33].

Thermal control, although widely used, is based on metabolic slowdown due to enzymatic reduction at lower temperatures [6], maintaining oocytes in buffered media at 22 - 27°C [7]. Although this technique does not cause apparent adverse effects, its efficacy in optimizing oocyte competence remains poorly proven, and the mechanisms sustaining meiotic arrest without inhibitors have not been fully clarified [35].

Another relevant factor is follicular heterogeneity at the time of OPU, which directly influences the morphological quality of oocytes and cumulus cells, impacting their competence to generate viable embryos [22, 27]. Since OPU may partially remove cumulus, complicating classification, it is important to highlight that bovine studies show NPPC can inhibit meiotic resumption even in denuded oocytes, confirming that the NPPC–NPR2 pathway acts directly on the oocyte [31]. This feature broadens the molecule's application possibilities, as its action does not depend exclusively on the follicular microenvironment. Since NPPC acts as a physiological inhibitor of meiotic resumption [33], its action elevates intracellular GMPc levels, which in turn inhibit PDE3A, the enzyme responsible for converting AMPc to 5'-AMP. PDE3A inhibition preserves AMPc levels in the oocyte, preventing activation of molecular events triggering meiotic resumption and consequently maintaining the oocyte in meiotic arrest [32, 24, 33]. Thus, NPPC not only resembles a natural organism process but also allows refined, biological control of oocyte maturation, unlike the generalized effect of temperature reduction.

Overall, the results indicate that NPPC offers refined control of nuclear maturation, preserving oocyte viability and quality and favoring more synchronized cytoplasmic maturation, which is crucial for the success of biotechnologies such as ICSI and embryo transfer. In summary, although prolonged NPPC use did not reach the same proportion of oocytes maintained in GV observed in Holding, its effects on preserving chromatin and maintaining earlier stages indicate important physiological potential for meiotic arrest in equines. By reproducing endogenous follicular conditions and avoiding thermal shock, NPPC emerges as a promising alternative, deserving further study to consolidate its use in pre-IVM protocols in this species.

Acknowledgments

This study was funded in part by the National Council for Scientific and Technological Development- Brasil (NPPCq) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP grant no. 2023/07531-3).

5 References

[1] Lewis n, Hinrichs k, Leese Hj, Argo cm, Brison Dr, Sturmey r. Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation. Scientific Reports 2020; 10:34-93.

[2] Ginther, Oj. Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects. 445 Equiservices, Cross Plains, 2º ed, 1992; 642.

[3] Hinrichs, K. Immature oocyte collection and maturation. In Equine Reproduction, 2nd ed.; McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D., Eds.; Wiley-Blackwell: Ames, IA, USA, 2011; Volume 2; pp. 2931–2935

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

[5] GILCHRIST, Robert B.; THOMPSON, Jeremy G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. Theriogenology, New York, v. 67, n. 1, p. 6–15, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.027. Epub 7 nov. 2006.

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

[7] CHOI, Y. H. et al. 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.

[8] HINRICHS, Katrin. Assisted reproductive techniques in mares. Reproduction in Domestic Animals, [S.l.], v. 53, n. S3, p. 4–13, 2018. DOI: 10.1111/rda.13259.

[9] Buratini, J.; Soares, A.C.S.; Barros, R.G.; Dellaqua, T.T.; Lodde, V.; Franciosi, F.; Dal Canto, M.; Renzini, M.M.; Luciano, A.M. Physiological parameters related to oocyte nuclear differentiation for the improvement of IVM/IVF outcomes in women and cattle. Reproduction, Fertility and Development, v. 34, n.2, p. 27- 35, 2021.

[10] Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction. 2001 May;121(5):647-53. doi: 10.1530/rep.0.1210647. PMID: 11427152.

[11] Zhang, M., Su, Y. Q., Sugiura, K., Xia, G., & Eppig, J. J. (2010). Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. Science, 330(6002), 366-369. https://doi.org/10.1126/science.1193573

[12] Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., & Conti, M. (2009). Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. Biology of Reproduction, 81(3), 595–604. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077768

[13] Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. Development, 136(11), 1869–1878. https://doi.org/10.1242/dev.035238

[14] Jaffe, L. A., & Egbert, J. R. (2017). Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. Annual Review of Physiology, 79, 237–260. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034108

[15] Kondo, M., Okamoto, S., Yamashita, Y., Kimura, K., & Sato, E. (2017). Role of natriuretic peptide precursor C/natriuretic peptide receptor 2 signaling in the oocyte meiotic arrest. Journal of Reproduction and Development, 63(1), 1–6. https://doi.org/10.1262/jrd.2016-101

[16] Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2016). Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Human Reproduction Update, 14(2), 159–177. https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040

[17] He, M.; Zhang, T.; Yang, Y.; Wang, C. Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. Front. Cell Dev. Biol. 2021, 9, 654028

[18] Guixue, Z.; Luciano, A.; Coenen, K.; Gandolfi, F.; Sirard, M. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. Theriogenology 2001, 55, 1733–1743

[19] Luciano, A.M.; Franciosi, F.; Modina, S.C.; Lodde, V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism (s). Biol. Reprod. 2011, 85, 1252–1259.

[20] Nogueira, D.; Cortvrindt, R.; De Matos, D.; Vanhoutte, L.; Smitz, J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes in vitro. Biol. Reprod. 2003, 69, 2045–2052.

[21]. Zuccotti, M.; Giorgi Rossi, P.; Martinez, A.; Garagna, S.; Forabosco, A.; Redi, C.A. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. Biol. Reprod. 1998, 58, 700–704.

[22] Vernunft, A., Alm, H., Tuchscherer, A., Kanitz, W., Hinrichs, K. andTorner, H. (2013) Chromatin and cytoplasmic characteristics of equineoocytes recovered by transvaginal ultrasound-guided follicle aspirationare influenced by the developmental stage of their follicle of origin.Theriogenol. 80, 1-6

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

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

[25] LAZZARI, Giovanna et al. Laboratory production of equine embryos. Journal of Equine Veterinary Science, v. 89, p. 103097, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103097.

[26] SARAIVA, Helena Fabiana Reis de Almeida et al. Meiotic arrest, resumption and TZP retraction in bovine COCs undergoing pre-IVM: lessons from a refined GV stage classification. Reproduction, v. 169, e230235, 2025. DOI: https://doi.org/10.1530/REP-23-0235.

[27] Luciano AM, Sirard M-A. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter 400 of follicular differentiation. Biol Reprod 2018;98:162–9. 401 doi:10.1093/biolre/iox149.

[28] Claes, A., Galli, C., Colleoni, S., Necchi, D., Lazzari, G., Deelan, C.,Beitsma, M. and Stout, T.A. (2016) Factors influencing oocyte recoveryand in vitro production of equine embryos in a commercial OPU/ICSIprogram. J. Equine. Vet. Sci. 41, 68

[29] Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R. and Lazzari, G. (2016) Male factorsaffecting the success of equine in vitro embryo production by ovum pickup-intracytoplasmic sperm injection in a clinical setting. J. Equine. Vet.Sci. 43, S6-S10

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

[31] ZHANG, M. et al. Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions. Molecular Cell, [S.l.], v. 72, n. 6, p. 1021–1034.e4, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.029.

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

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

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

[35] LODDE, V., COLLEONI, S., TESSARO, I., CORBANI, D., LAZZARI, G., LUCIANO, A. M., GALLI, C., & FRANCIOSI, F. (2014). 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. https://doi.org/10.1071/RD19230

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

Figures

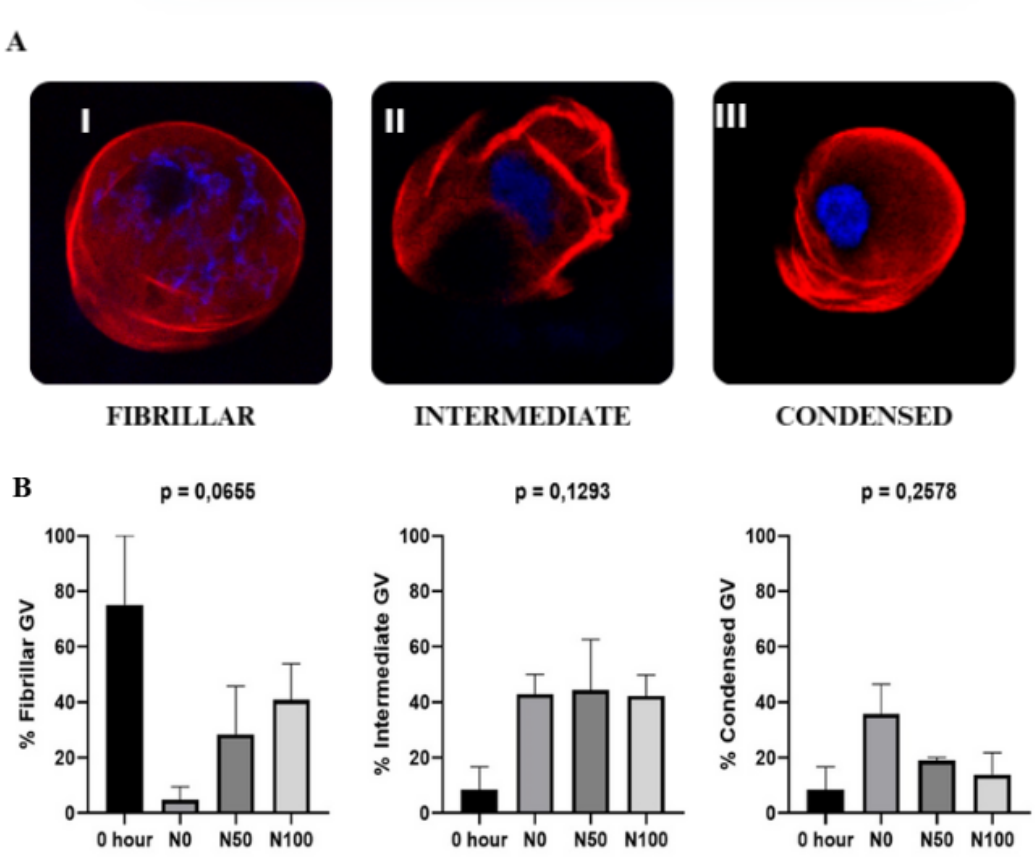


Figure 1: (**A**) Representative images of fibrillar, intermediate and condensed chromatin at GV stage. (**B**) Percentage distribution of germinal vesicle (GV) stages in different experimental groups. The graph on the left represents the percentage of oocytes in the fibrillar GV stage, the central graph shows the percentage in the intermediate GV stage, and the graph on the right shows the percentage in the condensed GV stage. The conditions analyzed include time zero (black bar) and different NPPC concentrations (N0, N50, and N100, gray bars). p-values indicate the absence of statistically significant differences between treatments ($p > 0.05$).

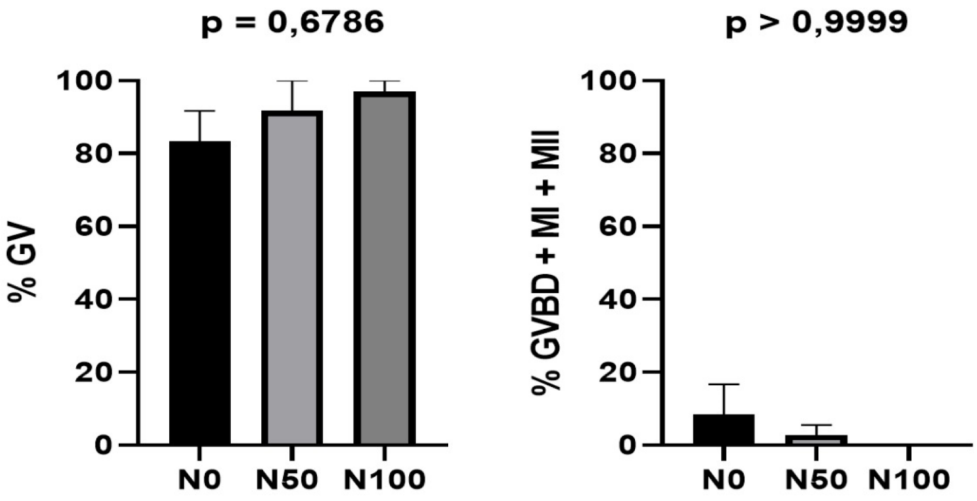


Figure 2: Effect of NPPC supplementation (0, 50, and 100 nM) on meiotic progression of oocytes maintained at the GV stage. The left panel shows the percentage of oocytes that remained at the GV stage for each treatment group (N0, N50, N100), with no statistically significant differences observed between groups ($p = 0.6786$, one-way ANOVA). The right panel displays the percentage of oocytes that progressed to GV degradation (GVBD), MI, or MII, also with no statistically significant differences ($p > 0.9999$, one-way ANOVA). Data are expressed as mean ± standard error of the standard error.

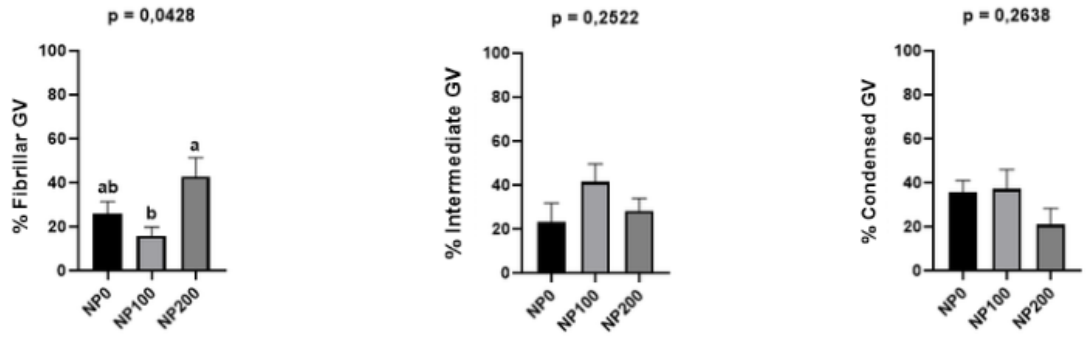


Figure 3: Percentage distribution of GV stages across different experimental groups. The left graph represents the percentage of oocytes at the fibrillar GV stage, the center graph shows the percentage at the intermediate GV stage, and the right graph displays the percentage at the condensed GV stage. In the left graph, corresponding to the fibrillar stage, a statistically significant difference was observed between the groups ($p = 0.0428$), with the NP200 group showing the highest percentage at this stage.

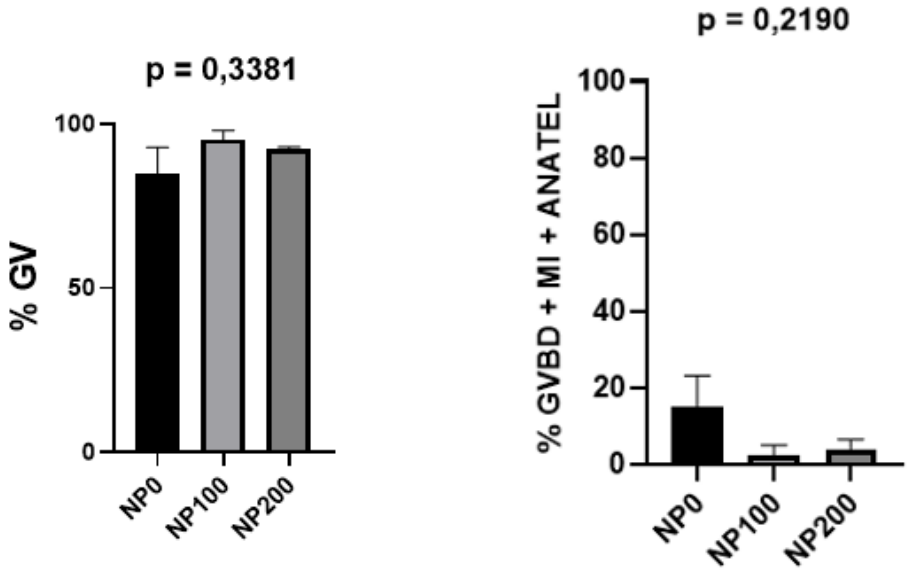


Figure 4: Effect of supplementation with different concentrations of NPPC (0, 100, and 200 nM) on the maintenance of the GV stage and meiotic resumption. The left graph represents the percentage of oocytes

maintained at the GV stage, while the right graph shows the percentage of oocytes that underwent germinal vesicle breakdown (GVBD), reached metaphase I (MI), or exhibited anaphase/telophase (ANATEL). The p-values indicate no statistically significant differences among the groups (ANOVA).

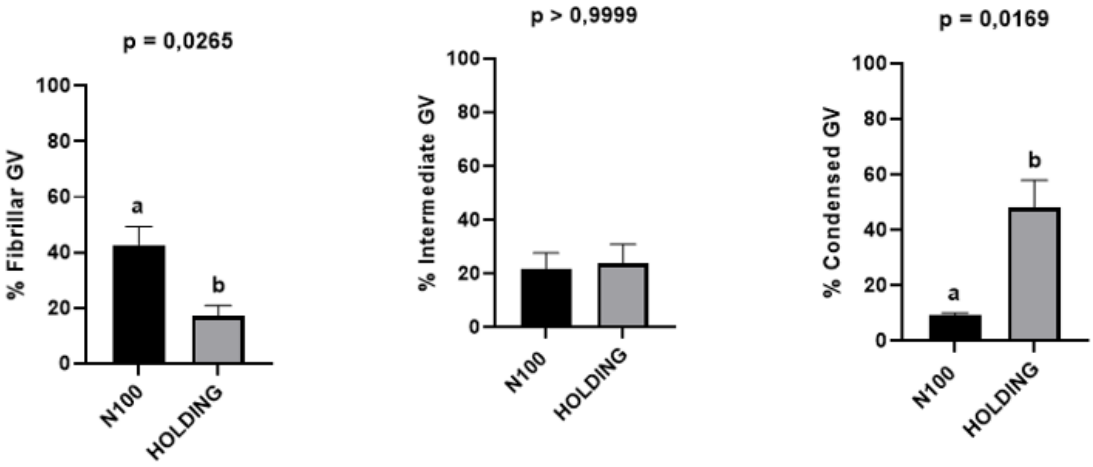


Figure 5: Effect of NPPC supplementation (100 nM) compared to low-temperature storage (*Holding*) on chromatin configuration in oocytes maintained at the GV stage. The left panel shows the percentage of oocytes presenting fibrillar chromatin, the middle panel depicts the percentage of oocytes with intermediate chromatin configuration, and the right panel illustrates the percentage of oocytes exhibiting condensed chromatin. Statistical differences between N100 and Holding groups were assessed using Student's t-test. $p < 0.05$ values indicate statistical significance. Bars with different letters denote significant differences.

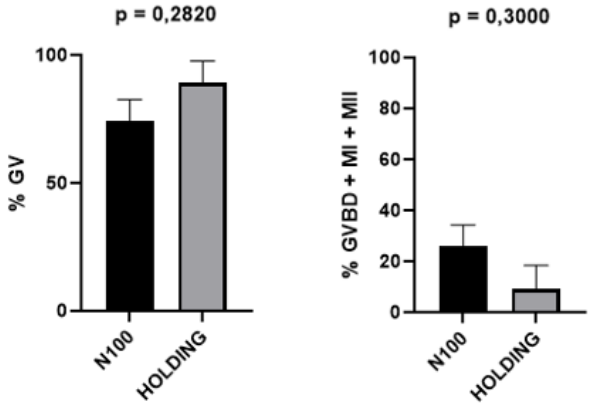


Figure 6: Effect of NPPC supplementation (100 nM) compared to low-temperature storage (*Holding*) on meiotic progression of oocytes maintained at the GV stage.The left panel shows the percentage of oocytes remaining at the germinal vesicle (GV) stage, while the right panel displays the percentage of oocytes that progressed to GV breakdown (GVBD), metaphase I (MI), or metaphase II (MII).No statistically significant differences were observed between the N100 and *Holding* groups ($p > 0.05$, Student's t-test).