

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:  
EQUINOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPLEXO CÚMULUS - OVÓCITO EQUINO  
ANTES E APÓS A VITRIFICAÇÃO**

Autor: Mauro Flores Polenz

Orientador: Prof. Dr. Sandra Fiala Rechsteiner

Porto Alegre



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:  
EQUINOS

**Expressão gênica de complexo cúmulus - ovócito equino antes e após a vitrificação**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos, sob a orientação da Prof. Dr. Sandra Mara Fiala Rechsteiner.

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Flores Polenz, Mauro  
Expressão gênica de complexo cúmulus-ovócito equino antes e após a vitrificação / Mauro Flores Polenz. -- 2016.  
79 f.

Orientadora: Sandra Mara Fiala Rechsteiner.  
Coorientador: Gabriel Ribas Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. vitrificação. 2. ovócito equino. 3. expressão gênica. 4. apoptose. I. Fiala Rechsteiner, Sandra Mara, orient. II. Ribas Pereira, Gabriel, coorient. III. Título.

## **Expressão gênica de complexo cúmulos ovócito equino antes e após vitrificação**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos, sob a orientação da Prof. Dr. Sandra Fiala Rechsteiner.

### **APROVADO POR:**

---

Prof. Dr. Sandra Fiala Rechsteiner

Orientadora

---

Med. Vet. PhD Gabriel Ribas Pereira

Membro da Comissão

---

Med. Vet. Dra. Anita Pimentel

Membro da Comissão

---

Prof. PhD. Marcelo Bertolini

Membro da Comissão



## **DEDICATÓRIA**

Ao meu avô Arthur Polenz, por tudo.





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Carlos Henrique e Neila pela educação e inspiração profissional.

À Debora Rosolen por estar sempre ao meu lado.

Aos meus tios David e Marlene pelo acolhimento.

À Prof. Dr. Sandra Fiala Rechsteiner pela orientação, oportunidade e credibilidade.

Ao Med. Vet. PhD Gabriel Ribas Pereira pela orientação, a quem credito minha carreira profissional.

Ao Geovani Augusto pela generosidade e companheirismo fundamental para a realização deste estudo.

Ao Med. Vet. PhD Márcio Nunes pelo constante ensinamento profissional e auxílio neste estudo.

Ao Med. Vet. MSc Vitor Braga Rissi pela contribuição em maturação dos ovócitos.

Ao Med. Vet. Dr. Werner Glazner pelos conselhos em pesquisa básica.

À Med. Vet. Dra. Kalyne Bertolin pela dedicação a este estudo e auxílio em expressão gênica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal – Equinos (PPGMA/Equinos) pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo apoio na pesquisa.

Ao Frigorífico Foresta pela disponibilidade de material para pesquisa.

À equipe do Frigorífico Foresta, em especial ao Paraguassu Alves da Silva.

Ao Med. Vet. Miguel Botis Bartolome Linardakis pelo apoio ao conhecimento científico.



*Ame muitas coisas,  
porque em amar está a verdadeira força.  
Quem ama muito conquistará muito,  
e o que for feito com amor estará bem feito.  
(Vincent Van Gogh)*



## EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPLEXO CÚMULUS-OVÓCITO EQUINO ANTES E APÓS A VITRIFICAÇÃO

Autor: Mauro Flores Polenz

Orientador: Sandra Fiala Rechsteiner

### RESUMO

A vitrificação de ovócitos pode ser de grande auxílio na manutenção genética após a morte e na pesquisa científica preservando ovócitos em diferentes estágios de maturação. Esta técnica é uma biotecnologia pouco utilizada na espécie equina devido às baixas taxas de viabilidade celular após a criopreservação. O objetivo deste estudo foi determinar a expressão de genes ligados a viabilidade celular e apoptose em complexos cúmulus ovócitos (CCOs) antes e após à vitrificação. Com este propósito, folículos entre 5 a 30 mm foram aspirados e 240 CCOs imaturos foram recuperados em abatedouro localizado em São Gabriel, RS, durante a estação reprodutiva. Os CCOs foram divididos em dois grupos: não vitrificados (n=120) e vitrificados (n=120). O protocolo de vitrificação foi realizado de acordo com método comercial EquiPro-VitKit (Minitube-Alemanha). Após vitrificação, CCOs foram mantidos em meio de maturação *in vitro* durante 6 horas e avaliados imediatamente. Os genes utilizados para análise de viabilidade dos CCOs foram: “bone morphogenetic protein” 15 (BMP 15); bcl-2- “like protein” 4 (BAX); Caspase 3 (CASP 3) e GAPDH (controle). A análise gênica foi realizada através do método de real-time PCR quantitativo (qRT-PCR). Foi observada diferença na expressão de mRNA do gene BAX ( $0.85 \pm 0.08$ ) em CCOs não vitrificados em comparação com vitrificados ( $2.05 \pm 0.47$ ;  $P = 0.03$ ). Não foi observada diferença na expressão de mRNA do BMP15 ( $1.55 \pm 0.73$ ) em CCOs não vitrificados em comparação com vitrificados ( $2.84 \pm 2.20$ ;  $P > 0.05$ ). Não foi observada diferença na expressão de mRNA do CASP3 ( $0.63 \pm 0.20$ ) em CCOs não vitrificados em comparação com vitrificados ( $0.64 \pm 0.01$ ;  $P > 0.05$ ). Em conclusão, os resultados observados na expressão de BMP15 sugerem a permanência da viabilidade celular em CCOs equinos, porém, BAX sugere a ativação do processo de apoptose nas células expostas ao processo de vitrificação.

Palavras-chave: Vitrificação; Ovócito equino; Expressão gênica; Apoptose.



## GENE EXPRESSION OF EQUINE CUMULUS OOCYTE COMPLEXES PRIOR AND AFTER VITRIFICATION

Author: Mauro Flores Polenz

Adviser: Sandra Fiala Rechsteiner

### ABSTRACT

Oocyte vitrification is a modern technique that can be used to ensure genetic maintenance after animal death and to improve oocyte cryopreservation at different stages of maturation. Equine oocyte vitrification is a biotechnology rarely used in horses due to the low post-cryopreservation cell viability. The aim of this study was to determine the expression of genes linked to cell viability and apoptosis in equine cumulus-oocyte complexes (COCs) prior and after vitrification. With this purpose, 5 to 30 mm ovarian follicles were aspirated and 240 COCs were collected from a slaughterhouse in Southern Brazil during breeding season. The COCs were divided into two groups: non-vitrified control COCs (CON, n=120) and vitrified oocytes (VIT, n=120). Vitrification protocol was provided according to a commercially available method from EquiPro-VitKit. After vitrification, COCs were *in vitro* matured for 6 hours and immediately evaluated. Genes product abundance were: Bone morphogenetic protein 15 (Bmp 15); Bcl-2-associated X protein (Bax); Caspase 3 (Casp 3); and GAPDH (control). The gene expression analysis was performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Difference was observed in COCs mRNA abundance for Bax gene from non-vitrified ( $0.85 \pm 0.08$ ) compared to vitrified ( $2.05 \pm 0.47$ ;  $P = 0.03$ ). No difference was observed in the COCs mRNA abundance for Bmp 15 from non-vitrified ( $1.55 \pm 0.73$ ) compared to vitrified ( $2.84 \pm 2.20$ ;  $P > 0.05$ ). There was no difference in mRNA abundance for Casp 3 in non-vitrified ( $0.63 \pm 0.20$ ) compared to vitrified ( $0.64 \pm 0.01$ ;  $P > 0.05$ ). In conclusion, results demonstrate that Bmp 15 expression in vitrified COCs indicate cell viability; however, Bax suggest the activation of apoptosis cascade in cells exposed to vitrification process.

Key words: Vitrification; Equine oocyte; Gene expression; Apoptosis.





## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Primers used in the expression analysis .....	64
--	----



## RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1** - Straw containing two COCs loaded in the vitrification medium and hold with two columns galactose (Gal) medium. .... 61
- Figura 2** - (A) Non-vitrified oocyte at the germinal vesicle (GV) having fibrilar chromatin configuration; (B) Vitrified oocyte at the GV exhibiting a tightly condensed nucleus chromatin configuration. Scale bar represents 20  $\mu$ m. .... 62
- Figura 3** - Relative expression of Bax, BMP15, CASP3 genes in vitrified and non-vitrified COCs. .... 63



## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>ARTs</b>	Assisted reproductive techniques – Técnicas de reprodução assistida
<b>BAX</b>	<i>Bcl-2-associated x protein</i> – Proteína x associada à Bcl-2
<b>BCL-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i> – Linfoma de células B-2
<b>BMP 6</b>	<i>Bone morphogenetic protein 6</i> – Proteína morfogenética óssea 6
<b>BMP15</b>	<i>Bone morphogenetic protein 15</i> – Proteína morfogenética óssea 15
<b>BMPs</b>	<i>Bone morphogenetic proteins</i> – Proteínas morfogenéticas ósseas
<b>CASP3</b>	Caspase 3
<b>CC</b>	<i>Condensed Chromatin</i> – Cromatina condensada
<b>CCOs</b>	Complexo cúmulus ovócitos
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i> – DNA complementar
<b>CGPs</b>	Células germinativas primordiais
<b>COCs</b>	<i>Cumulus oocyte complexes</i> – Complexo cúmulus ovócitos
<b>COX2</b>	<i>Cyclooxygenase 2</i> – Ciclooxygenase 2
<b>Cp</b>	Compacto
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
<b>DNase</b>	<i>Deoxyribonuclease</i> – Desoxirribonuclease
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EG</b>	Etileno glicol
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i> – Fator de crescimento epidermal
<b>eGH</b>	<i>Equine growth hormone</i> – Hormônio do crescimento equino
<b>eLH</b>	<i>Equine luteinizing hormone</i> – hormônio luteinizante equino
<b>Exp</b>	Expandido
<b>F</b>	<i>Fibrillar</i> – Fibrilar
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i> – Soro fetal bovino
<b>FGF</b>	<i>Fibroblastic growth factor</i> – Fator de crescimento fibroblástico
<b>FIGα</b>	<i>Factor in the germline alpha</i> – Fator na linha germinativa alfa
<b>FN</b>	<i>Fluorescent Nucleus</i> – Núcleo fluorescente
<b>FSH</b>	<i>Follicle stimulating hormone</i> – Hormônio folículo estimulante
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GC</b>	Grânulos corticais
<b>GDF-9</b>	<i>Growth Differentiation Factor 9</i> – Fator de crescimento e diferenciação 9
<b>GH</b>	<i>Growth hormone</i> – Hormônio do crescimento
<b>GIFT</b>	<i>Gamete intrafallopian transfer</i> – Transferência intrafalopiana de gameta
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotropin releasing hormone</i> – Hormônio liberador de gonadotrofinas
<b>GREM1</b>	<i>Gremlin 1</i>
<b>GV</b>	<i>Germinal vesicle</i> – Vesícula germinativa
<b>GVBD</b>	<i>Germinal vesicle breakdown</i> – Avaria de vesícula germinativa
<b>HAS2</b>	<i>Hyaluronic acid synthase 2</i> – Ácido hialurônico sintase 2
<b>hCG</b>	<i>Human chorionic gonadotrophin</i> - Gonadotrofina coriônica humana
<b>I</b>	<i>Intermediate</i> – Intermediário



<b>ICSI</b>	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i> – Injeção espermiática intracitoplasmática
<b>IETS</b>	<i>International embryo transfer society</i> – Associação internacional de transferência de embriões
<b>IGFBPs</b>	<i>Insulin-like growth factor binding proteins</i> – Proteínas de ligação IGF
<b>IGF-I</b>	<i>Insulin-like growth factor-1</i> – Fator de crescimento semelhante à insulina 1
<b>IGFs</b>	<i>insulin-like growth factors</i> – Fatores de crescimento semelhante à insulina
<b>IVM</b>	<i>In vitro maturation</i> – Maturação <i>in vitro</i>
<b>LH</b>	<i>Luteinizing hormone</i> – Hormônio luteinizante
<b>LN<sub>2</sub></b>	<i>Liquid nitrogen</i> – Nitrogênio líquido
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen activated protein kinase</i> – Proteína quinase ativadora da maturação
<b>MFP</b>	<i>Maturation-promoting factor</i> – Fator promotor de maturação
<b>M-I</b>	<i>Metaphase 1</i> – Metáfase 1
<b>M-II</b>	<i>Metaphase 2</i> – Metáfase 2
<b>min</b>	Minuto
<b>MIV</b>	Maturação <i>in vitro</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>mU</b>	Miliunidade
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NOBOX</b>	<i>Newborn ovary homeobox protein</i> – Proteína homeobox ovário recém-nascido
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia de polimerase
<b>PTX3</b>	<i>Pentraxina 3</i>
<b>qRT-PCR</b>	<i>Quantitative real-time PCR</i> – PCR tempo-real quantitativo
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> – PCR transcriptase reversa
<b>TCM-199</b>	<i>Tissue culture medium-199</i> – Meio de cultivo tecidual-199
<b>TE</b>	Transferência de embrião
<b>TGFβ</b>	<i>Transforming growth factor beta</i> – Fator transformador de crescimento beta
<b>U</b>	Unidade
<b>VG</b>	Vesícula germinativa
<b>ZP</b>	Zona pelúcida





## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1 Oogênese e Foliculogênese .....	30
2.2 Competência Ovocitária .....	34
2.3 Maturação de Ovócitos.....	35
2.4 Vitriificação de Ovócitos.....	38
2.5 Marcadores de viabilidade ovocitária.....	40
3. HIPÓTESE.....	43
4. OBJETIVOS .....	43
CAPÍTULO II.....	44
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	65
6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66



## **CAPÍTULO I**



## 1. INTRODUÇÃO

As biotécnicas de reprodução assistida têm sido amplamente utilizadas em equinos nas últimas décadas. O alto valor econômico destes animais justifica o trabalho e despesas necessários para a obtenção de nascimentos através das biotécnicas. As biotécnicas utilizadas incluem transferência de embriões, transferência de ovócitos, injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) em ovócitos aspirados *in vivo* ou obtidos *post-mortem* em abatedouros, transferência nuclear, biópsia de embriões para diagnóstico genético pré-implantação e vitrificação de embriões (HINRICHS, 2013). De acordo com a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), em 2013 foram realizadas 19680 transferências de embriões (TE) equinos no Brasil, 17% maior que 2012, quando foram coletados e transferidos 16800 embriões (PERRY, 2015).

A criopreservação de embriões, ovócitos e tecido ovariano são os três principais métodos para a preservação de fertilidade na fêmea (CHIAN *et al.*, 2014). A criopreservação de embriões e ovócitos é um processo com reduzida viabilidade celular em fêmeas pré-púberes, sendo a preservação do tecido ovariano a melhor opção. Por outro lado, a vitrificação de ovócitos permite a preservação de estruturas celulares funcionais para que a escolha do sêmen ocorra no momento que for desejado pelo proprietário do animal (HINRICHS 2013, CURCIO *et al.* 2014). Portanto, esta técnica é de fundamental importância como uma opção para o manejo reprodutivo de animais da espécie equina.

A capacidade de efetivamente criopreservar ovócitos seria um grande benefício na criação de equinos por diversas razões. Clinicamente, quando ovócitos são recuperados *post-mortem* de éguas que sofrem morte prematura, os proprietários devem decidir imediatamente qual garanhão será destinado para produzir os últimos embriões obtidos a partir deste animal. Os proprietários compreensivelmente desejam ter a capacidade de decidir isso no futuro. Além disso, mesmo se um ótimo garanhão é conhecido pelo proprietário da égua, às vezes não é possível obter o sêmen desejado a tempo, optando-se assim por um garanhão menos adequado (HINRICHS, 2013; CANESIN *et al.*, 2015). A criopreservação de ovócitos equinos será de grande benefício para a pesquisa de biotécnicas da reprodução animal como fonte de material para pesquisas científicas, podendo ser utilizada na organização de bancos genéticos contendo ovócitos criopreservados em diferentes fases de maturação. Entretanto, um dos principais desafios para que esta biotecnologia seja utilizada com ampla difusão se deve à escassez de ovócitos equinos para análise de viabilidade, bem como, pela ausência de frigoríficos em

diversos países para incrementar a situação do uso desta biotécnica da reprodução na espécie equina. Para que tal procedimento seja concretizado, os ovócitos poderão ser recuperados e criopreservados no local de coleta e, em seguida, transportados para laboratórios e centro de pesquisas para utilização em procedimentos *in vitro*.

As taxas de blastocistos, gestações e nascimentos em humanos a partir de ovócitos vitrificados podem ser equivalentes as de ovócitos frescos segundo COBO *et al.*, (2010), e de acordo com o guia lançado pelos comitês da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva e Sociedade de Tecnologia da Reprodução Assistida (*Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology, 2013*). A vitrificação de ovócitos humanos não deve mais ser tratada como um procedimento experimental podendo ser recomendada para casos de terapias gonadotóxicas, tornando-se uma importante ferramenta para manutenção genética. Contudo, esta informação torna-se crucial para o entendimento do processo de vitrificação para a espécie equina e outras espécies de animais domésticos com alto valor comercial.

No entanto, a criopreservação de ovócitos equinos continua a ser um desafio devido aos baixos índices de sobrevivência e desenvolvimento celular. Além disso, grande parte dos estudos utiliza ovócitos maturados, devido aos melhores resultados obtidos comparado com ovócitos imaturos (LUNA *et al.*, 2001, MARA *et al.*, 2013; MASSIP, 2003). Infelizmente, pouca informação está disponível sobre vitrificação de ovócitos equinos imaturos e há grande expectativa na comprovação deste método juntamente com a possibilidade da preservação genética de fêmeas desta espécie, sendo necessário mais estudos que possam comprovar e habilitar a vitrificação para este fim.

A utilização de novas biotecnologias da reprodução visa um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo (HINRICHS, 2013; CHENIER *et al.* 2015). A adequação de procedimentos de maturação de ovócitos e novos métodos para vitrificar ovócitos *in vitro* pode acelerar significativamente as técnicas reprodutivas na espécie equina (CURCIO *et al.*, 2014; CANESIN *et al.*, 2015). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica de ovócitos imaturos submetidos à vitrificação de complexos cúmulus-ovócitos (CCOs) equino através da observação de genes associados à apoptose e viabilidade celular.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Oogênese e Foliculogênese

É durante a vida fetal que a oogênese tem início e a mesma somente é completada meses ou até anos após o nascimento do indivíduo. As células germinativas derivam do mesoderma extraembrionário e dependem de sinais provenientes do ectoderma extraembrionário e do endoderma visceral para o seu desenvolvimento inicial e passam a se chamar oogônias assim que estão estabelecidas no ovário em desenvolvimento. Estas células sofrem sucessivas divisões mitóticas e eventualmente passam por uma última etapa de replicação de seu DNA, anteriormente a sua entrada em meiose sendo então denominadas ovócitos, onde o número de ovócitos produzidos se torna maior do que o necessário para a vida reprodutiva do indivíduo (PICTON *et al.*, 1998; VAN DEN HURK *et al.*, 1997).

As etapas de formação dos ovócitos são constituídas pela formação das células germinativas primordiais (CGPs), migração das CGPs para as futuras gônadas, colonização das gônadas pelas CGPs, proliferação das CGPs, diferenciação das CGPs em oogônias, início da meiose e parada no estágio de diplóteno da prófase I da meiose (EDDY *et al* 1981; VAN DEN HURK & ZHAO 2005).

Após a origem no mesoderma extraembrionário, ocorre a migração, proliferação e colonização das gônadas em desenvolvimento pelas células germinativas iniciais o que é controlado por vários fatores e dependente também da interação com as células somáticas que as circundam. Dentre estes fatores estão os membros da família do fator transformador de crescimento  $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$  – TGF $\beta$ ), como as proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic protein* – BMPs) que são importantes para a formação das CGPs e regulação da expressão de genes (YING & ZHAO, 2001; SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

Em mamíferos, a proliferação de células germinativas primordiais ocorre por mitose e meiose no córtex ovariano. A multiplicação por mitose inicia aos 50 dias de gestação, ocorrendo até o 160º dia de gestação aproximadamente. O processo de divisão meiótica inicia entre o 75º e 160º dia de gestação, quando as oogônias se transformam em ovócitos primários, permanecendo na primeira prófase meiótica (repouso meiótico) até o início da puberdade na fase de diplóteno da prófase I, também chamada dictióteno ou vesícula germinativa (VG) (GINTHER, 1989; PIERSON, 1993; PICTON, 2001). Os

ovócitos primários se apresentam rodeados por uma estreita camada de células da granulosa, formando assim, os folículos primordiais. Durante o desenvolvimento folicular pré-antral (primordiais, primários e secundários), ocorre a diferenciação nuclear, com aumento progressivo do número de organelas, formação dos grânulos corticais e desenvolvimento das junções tipo *GAP* entre o ovócito e as células da granulosa. Nos folículos secundários, observa-se a formação de duas ou mais camadas de células da granulosa. Neste estágio, o ovócito entra em fase de crescimento extensivo, as células da granulosa se tornam mais proliferativas e a camada da teca se desenvolve ao redor da granulosa (VAN DEN HURK, *et al.*, 2005).

O ovócito precisa crescer para se tornar competente, ou seja, ser capaz de concluir a maturação nuclear e citoplasmática, ser fertilizado e passar por clivagem celular. Durante o crescimento ovocitário na espécie equina ocorre uma mudança estrutural crucial, ocorrendo o endurecimento da zona pelúcida (ZP) que tem função protetora ao redor do ovócito, sendo esta formada por três glicoproteínas ZP1, ZP2 e ZP3 que são essenciais para o desenvolvimento ovocitário e da foliculogênese (SOYAL *et al.*, 2000). Os folículos secundários são pouco vascularizados, o que poderia indicar que fatores endócrinos são pouco importantes para a regulação de seu desenvolvimento. No entanto, sabe-se que o número de folículos secundários em desenvolvimento, seu tamanho, o número de células e a taxa de atresia são influenciados pelas gonadotrofinas, e o hormônio folículo estimulante (FSH) é fator de sobrevivência predominante além de estimular a formação da junção do tipo *GAP* nas células da granulosa (VAN DEN HUNK *et al.*, 2000).

Na puberdade, durante o processo ovulatório, irá ocorrer a retomada das divisões meióticas sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) (DEKEL, *et al.*, 1988). Logo antes da ovulação, a maturação do ovócito evolui para o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (ovócito secundário) influenciado pela presença do Fator Promotor da Maturação (*Maturation-promoting factor* – MPF) e da proteína quinase ativadora da maturação (*Mitogen activated protein kinase* – MAPK) sendo caracterizada pelo aparecimento do primeiro corpúsculo polar. O ovócito terciário ou zigoto somente se forma no momento em que ocorre a fertilização, sendo identificado pelo aparecimento do segundo corpúsculo polar e formação do pró-núcleo masculino e feminino (GOUDET, *et al.*, 1998; PALMER, *et al.*, 1987).



A foliculogênese é o processo pelo qual folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para ovulação. Durante a foliculogênese o número de folículos que chegam ao estágio ovulatório é muito baixo, estima-se que aproximadamente 99% sofram atresia (WEBB *et al.*, 1999; JOHNSON, 2003). Concomitante à parada da meiose, os aglomerados de células germinativas se desfazem para dar início à formação dos folículos (PEPLING, 2006). O desenvolvimento folicular é dividido em três estágios subsequentes: 1) ativação do folículo primordial; 2) recrutamento e crescimento de outros folículos; 3) seleção do folículo dominante e atresia dos folículos subordinados (FORTUNE, 2003).

Folículos primordiais são menos desenvolvidos e mais populosos no ovário e são caracterizados pela presença do ovócito primário envolto por uma única camada de células foliculares (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997). De acordo com Driancout & Palmer (1984), éguas em atividade cíclica apresentam aproximadamente 36.000 folículos primordiais e 100 folículos em desenvolvimento. Entretanto, os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores deste desenvolvimento são pouco conhecidos nesta espécie.

Estudos demonstraram a importância das gonadotrofinas, hormônio do crescimento (GH), esteróides e andrógenos na ativação da competência do gameta feminino durante a foliculogênese (HARTSHORNE *et al.*, 1994; VENDOLA *et al.*, 1998; BACHELOT *et al.*, 2002; ZACZEK *et al.*, 2002). Também há evidências de que o início e o crescimento do folículo primordial requerem a expressão de vários fatores como receptores de gonadotrofinas, fator de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator fibroblástico de crescimento 2 (MCNATTY *et al.*, 1999). Em particular, membros do TGF- $\beta$  têm se mostrado potentes reguladores da proliferação e diferenciação em diferentes espécies (DURLINGER, *et al.*, 2002). Três membros da família TGF- $\beta$ , fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), *bone morphogenetic protein -15* e *-6* (BMP-15; BMP-6), são expressos pelo ovócito e se acredita serem mediadores para o crescimento do folículo pré-antral (HAYASHI *et al.*, 1999; ELVIN *et al.*, 2000; GALLOWAY *et al.*, 2000).

A transição de folículo secundário para terciário dá início a um novo passo de maturação em decorrência da competência ovocitária e da ação hormonal durante o processo da foliculogênese até o processo de ovulação. Em éguas, os folículos ovarianos desenvolvem um antro que atinge 300  $\mu$ m de diâmetro, o qual é preenchido por um fluido viscoso composto por hormônios esteróides. Durante esse processo, ocorre a formação da

camada da teca folicular ao redor da granulosa. Ocorre também nova proliferação das células da granulosa, as quais se organizam em várias camadas ao redor do ovócito, formando o complexo *cúmulus*-ovócito. As células da teca secretam principalmente andrógenos esteróides e as células da granulosa estrógeno e inibina que são elementos essenciais para a maturação nuclear e citoplasmática, além do processo de ovulação (KENNEY *et al.*, 1979; HAFEZ, 1995).

A espécie equina geralmente apresenta uma ou duas ondas foliculares durante os 21-22 dias do ciclo estral. As éguas são consideradas uma espécie monovulatória o que significa a ocorrência de ovulação de apenas um gameta durante um ciclo estral (GINTHER & BERGFELT, 1992). Com a elevação dos níveis plasmáticos de FSH ocorre o recrutamento folicular e o pico da concentração deste hormônio quando o folículo maior atinge, aproximadamente, 13 mm de diâmetro, com subsequente declínio devido a capacidade deste folículo de secretar inibina pelas células da granulosa nas gônadas da fêmea. Os dois maiores folículos crescem paralelamente até que o maior folículo alcance diâmetro de 22 mm, quando passam a ocorrer diferenças nas taxas de crescimento entre o maior folículo e os demais (GASTAL, *et al.*, 1997; GINTHER, 2000).

A fase de divergência é caracterizada pela seleção de um folículo dominante, em geral de 22,5 mm, e com diâmetro 3 mm superior ao do segundo maior folículo (GINTHER, *et al.*, 2003). O folículo dominante, apesar do declínio dos níveis de FSH sérico, é capaz de seguir seu crescimento e desenvolvimento, devido ao aumento na expressão de receptores para FSH (WEBB *et al.*, 1999). Além disso, há participação de fatores de crescimento locais no processo de seleção do folículo dominante (MONNIAUX *et al.*, 1997). Os fatores de crescimento fibroblástico (*Fibroblastic Growth Factor*; FGF), fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor*; EGF), fatores de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like Growth Factor*; IGFs) e suas proteínas de ligação (*Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*; IGFBPs) são considerados os mais importantes durante esta fase (GINTHER *et al.*, 2004).

A fase final da foliculogênese é controlada basicamente pelas gonadotrofinas, além de sofrer influência dos fatores locais conforme mencionados anteriormente. A partir do momento em que os folículos subordinados iniciam o seu declínio, o folículo dominante passa a crescer rapidamente. Em éguas, a taxa média de crescimento do folículo dominante é aproximadamente de 3 a 5 mm por dia chegando aproximadamente 39-45mm no momento da ovulação (PALMER & DRIANCOURT, 1980). Interiormente

também ocorrem alterações no folículo dominante, como o aumento nas concentrações de estrógenos, andrógenos e inibina no líquido folicular (PIERSON & GINTHER, 1987). Além disso, há um aumento expressivo de receptores de LH pelas células da teca, tornando o folículo responsivo ao LH pituitário (WEBB *et al.*, 1999), que resulta na ovulação após uma constante e lenta elevação na concentração sérica de LH na égua (GINTHER, 1987).

## 2.2 Competência Ovocitária

A competência ovocitária é definida como o potencial que o ovócito possui em atingir a maturação citoplasmática e nuclear, fecundação e desenvolvimento até o estágio de blastocisto (SIRARD, *et al.*, 2006) sendo capaz de passar a gestação, resultando no nascimento de um produto viável. Com relação a maturação *in vitro* (MIV), a competência meiótica de ovócitos equinos depende principalmente da configuração do cúmulus, tamanho do folículo do qual o ovócito foi recuperado e o período em que o ovócito se encontra no ovário antes da recuperação. O mesmo serve para o tempo de cultivo requerido para alcançar a taxa máxima de maturação (HINRICHS, 2010). Estudos em mulheres demonstraram que a redução na competência é a maior causa de baixa na fertilidade relacionada a idade avançada (NAVOT *et al.*, 1991). Atualmente, a seleção de ovócitos é baseada em critérios morfológicos subjetivos, que têm baixo poder preditivo para resultados na fecundação *in vitro* (RIENZI *et al.*, 2011).

Ovócitos equinos podem ser recuperados de folículos preovulatórios após estimulação com gonadotrofinas. Assim, essencialmente 100% dos ovócitos são meioticamente competentes. Ovócitos recuperados 24 h após estímulo das gonadotrofinas estarão em metáfase 1 (M-I) e os recuperados 35 h após o estímulo estarão em metáfase 2 (M-II) (BÉZARD *et al.*, 1997).

O método de classificação de ovócitos equinos varia entre laboratórios de acordo com o objetivo final de cada biotecnologia empregada nesta espécie (CHOI *et al.*, 2004). A utilização de CCOs compactos (Cp) e descarte de CCOs expandidos (Exp) vem sendo uma alternativa durante o processo de seleção ovocitária para a maturação *in vitro* ou *in vivo* deste tipo celular (CHOI *et al.*, 1993; GOUDET *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; TREMOLEDA *et al.*, 2001). Entretanto, as taxas de maturação nuclear de ovócitos equinos Exp têm se mostrado similares (DELL'AQUILA *et al.*, 2001) ou maiores que as

de ovócitos Cp (HINRICHS & SCHMIDT, 2000, CHOI, *et al.*, 2002). Dentre as diversas finalidades para utilizar ovócitos *in vitro* adotando diferentes sistemas na seleção ovocitária, devemos levar em consideração que CCOs Cp levam mais tempo para atingir M-II do que ovócitos Exp (ZHANG *et al.*, 1989; HINRICHS *et al.*, 1993; ALM e HINRICHS, 1996).

O fator limitante para o sucesso da produção *in vitro* de embriões equinos pode estar relacionado com a baixa competência dos ovócitos usados. Fatores que estejam relacionados a competência citoplasmática do ovócito, incluindo mRNA e proteínas, são vitais para o adequado crescimento e maturação, assim como para o desenvolvimento de um embrião viável após a fecundação (JIAO *et al.*, 2012). Genes específicos relacionados à competência ovocitária têm sido identificados em camundongos transgênicos. Estes genes influenciam o crescimento e desenvolvimento do ovócito, a integridade do complexo de células ovócito-granulosa, a maturação ovocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário primário (ACEVEDO & SMITH, 2005). Além disso, a idade avançada da doadora também parece ter efeito negativo sobre a competência ovocitária (RAMBAGS *et al.*, 2014).

A eficiência na produção *in vitro* de embriões equinos continua baixa devido à alta variabilidade na competência de ovócitos equinos imaturos (MOHAMMADI-SANGCHESHMEH *et al.*, 2013). De qualquer forma, os estudos que têm sido realizados para avaliar os fatores que afetam a maturação citoplasmática e nuclear de ovócitos (CHOI *et al.*, 2004; HINRICHS, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012; RAMBAGS *et al.*, 2014) demonstram a necessidade de mais pesquisa nesta área para uma melhor compreensão da competência ovocitária em equinos.

### **2.3 Maturação de Ovócitos**

A maturação ovocitária é frequentemente determinada pela presença ou ausência do primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico (CHOI *et al.* 2006; GINTHER *et al.* 2007). A MIV de ovócitos equinos foi primeiramente reportada por Fuka & Okolki (1981) atingindo 68% de maturação em M-II. Em equinos, as taxas de MIV de ovócitos diferem entre laboratórios, o que se deve parcialmente a métodos e meios de cultivo inapropriados ou ambos (DELL' AQUILA *et al.*, 1996; HINRICHS & WILLIAMS, 1997; CARNEIRO *et al.*, 2001; HINRICHS, 2010; PEREIRA *et al.*, 2013b). É reconhecido que em mamíferos a MIV de ovócitos requer tanto maturação nuclear quanto citoplasmática

para atingir um desenvolvimento embrionário normal (DAMIANI *et al.*, 1996; EPPIG, 1996; OGUSHI *et al.*, 2008). A migração dos grânulos corticais (GC) é um evento crítico que tem sido usado para acessar a maturação citoplasmática e organização das organelas (DUCIBELLA *et al.*, 1993; CARNEIRO *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2009). A migração dos GC até a periferia do ovócito e a presença de cromossomos alinhados na placa de metáfase são indicativos de completa maturação citoplasmática e nuclear. A taxa de maturação nuclear atingida é considerada como porcentagem de ovócitos que atingiram M-II. Portanto, características estruturais são comumente utilizadas para determinar a competência ovocitária durante o processo de maturação celular (SIDDIQUI *et al.* 2009).

Os ovócitos que são recuperados a partir de folículos pré-ovulatorios de éguas com ovulação estimulada estão normalmente em M-I, já reiniciaram a meiose e precisam apenas ser mantidos em cultivo até atingirem M-II, o que aconteceria 35 h após o estímulo com gonadotrofina coriônica humana (*Human Chorionic Gonadotrophin*; hCG) (BÉZARD *et al.*, 1997). Estes ovócitos são aspirados 24 h após a administração hCG e/ou hormônio liberador de gonadotrofinas (*gonadotropin releasing hormone- GnRH*) na égua doadora, sendo então cultivados por 12 a 18 h antes de serem transferidos ou fecundados por injeção intracitoplasmática do espermatozoide (MACLELLAN *et al.*, 2010; HINRICHS 2012). Este cultivo pode ser feito usando meio de cultivo (*Tissue Culture Medium-199*; TCM-199) com sais de Earle adicionado de 10% de soro fetal bovino em 5% CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 38.5°C (HINRICHS *et al.*, 1998; HINRICHS *et al.*, 2000; JACOBSON *et al.*, 2010).

No caso de ovócitos imaturos, a maturação pode ser realizada eficientemente usando TCM-199 com sais de Earle, 10% de soro fetal bovino e 5 mUI mL<sup>-1</sup> FSH bovino em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em temperatura de 38.2°C (HINRICHS *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2008). Os ovócitos recuperados podem ser classificados como Cp ou Exp. Portanto, diversos sistemas de maturação nuclear e citoplasmática vem sendo utilizados por vários grupos de pesquisa que utilizam MIV como protocolo base para outras biotecnologia da reprodução associadas à espécie equina.

De acordo com Carneiro *et al.* (2001), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor*; IGF-I) tem efeito positivo na maturação nuclear em ovócitos equinos maturados durante 36 h. Além disso, demonstrou que a adição de IGF-I no meio de maturação *in vitro* juntamente com FSH, LH, estradiol (E<sub>2</sub>) e soro fetal

bovino não aumenta a maturação nuclear mas promove maturação citoplasmática. Outros estudos detectaram receptores para o fator de crescimento epidermal (EGF) nos folículos, sendo mais proeminentes das células do cúmulus e granulosa, sugerindo a ação do EGF como mediador parácrino na sinalização de LH dando início ao processo de maturação (LINDBLOOM *et al.*, 2008) e sua adição ao meio aumentou a incidência de M-II comparado ao controle (70,4% e 22,5% respectivamente), sugerindo papel na regulação fisiológica na maturação via tirosina-kinase (LORENZO *et al.*, 2001).

Receptores de hormônio do crescimento equino (eGH) foram detectados em ovócitos equinos e células do cúmulus e a adição de eGH ao meio de maturação pode aumentar as taxas de maturação citoplasmática (MARCHAL *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2013a) e o uso concomitante de eGH na presença de E<sub>2</sub>, gonadotrofinas (FSH e LH) e soro fetal bovino tem efeito positivo na proporção de ovócitos compactos atingindo M-II (PEREIRA *et al.*, 2013b). Em equinos, ao contrário do que ocorre em bovinos, ovócitos Exp tem maior taxa de maturação do que ovócitos Cp (65% e 20%, respectivamente) (ALM & HINRICHS, 1996; HINRICHS & WILLIAMS, 1997; HINRICHS & SCHMIDT, 2000; CHOI *et al.*, 2004a; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH *et al.*, 2013). Entretanto, após o processo de MIV, ovócitos Cp e Exp produzem taxas equivalentes de blastocistos quando fertilizados por ICSI (HINRICHS *et al.*, 2005; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH., *et al.* 2013). A baixa taxa de maturação pode se dever ao fato de a maioria dos ovócitos Cp se originar de folículos viáveis, porém juvenis, que ainda não adquiriram competência meiótica (HINRICHS & WILLIAMS, 1997).

A aquisição da competência meiótica parece ocorrer quando o folículo atinge 20 mm em equinos (HINRICHS & SCHMIDT, 2000), porém a maioria das pesquisas utilizam ovócitos recuperados de folículos menores que este diâmetro. Entretanto, ovócitos Exp se originam de folículos atrésicos onde a habilidade do folículo em suprimir a aquisição da competência meiótica é perdida. Assim, ovócitos recuperados a partir de folículos pequenos são capazes de maturar (HINRICHS & SCHMIDT, 2000; PEREIRA *et al.*, 2013b). Hurtt *et al.*, (2000) não encontrou diferença na taxa de M-II entre ovócitos vitrificados imaturos ou maturados (30 e 40%, respectivamente).

O tempo adequado de maturação para a produção de blastocistos varia de acordo com o tipo de cúmulus e o tempo que o ovócito passa dentro do folículo antes de ser recuperado. Quando ovócitos imaturos são recuperados por aspiração, são predispostos a perder as células do cúmulus durante o processo, o que pode prejudicar a classificação

em Cp e Exp. Assim, para ovócitos aspirados o tempo de maturação recomendado é de 30 h de maturação, pois foi demonstrado que as taxas de desenvolvimento foram adequadas tanto para ovócitos Exp quanto Cp (HINRICHS *et al.*, 2005).

## 2.4 Vitrificação de Ovócitos

A criopreservação de ovócitos é uma técnica importante para a preservação de material genético feminino (VAJTA *et al.*, 1998; ATABAY *et al.*, 2004; CLARK e SWAIN, 2013). Entretanto, o processo de criopreservação pode induzir diversas lesões que comprometem o desenvolvimento ovocitário, como o rompimento do citoesqueleto e cromossomos (PARK *et al.*, 1997; SAUNDERS e PARKS, 1999; CHEN *et al.*, 2003) dano mitocondrial (RHO *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2004) e alterações da produção de fatores de crescimento necessários para a progressão da meiose (COMIZZOLI *et al.*, 2004).

Em 1985, Rall e Fahy demonstraram a abordagem inovadora de vitrificação, em que os danos relacionados com a formação de cristais de gelo provocados pela criopreservação são minimizados, utilizando altas concentrações de agente crioprotetor, em conjunto com a mudança rápida de temperatura. Sendo assim, a definição da vitrificação é a solidificação de uma solução em baixa temperatura sem a formação de cristais de gelo, aumentando a viscosidade devido as altas taxas de resfriamento (RALL e FAHY, 1985; KASAI, 1996).

Durante a vitrificação, o ovócito é rapidamente exposto a altas concentrações de crioprotetor antes de entrar em contato com nitrogênio líquido (LN<sub>2</sub>) (VAJTA *et al.*, 1998). Comparada com a criopreservação convencional, a vitrificação além de prevenir os danos causados pela formação de cristais de gelo intracelular, reduz o tempo necessário e o custo com equipamentos (ELDRIDGE-PANUSKA *et al.*, 2005). A taxa de resfriamento acredita-se ser >20.000°C/min (KUWAYAMA *et al.*, 2005) e este processo de resfriamento rápido pode minimizar os danos causados pelo frio e choque osmótico. Na última década, o processo de vitrificação de ovócitos evoluiu e se tornou uma confiável técnica de preservação genética feminina em diferentes espécies, por ser tecnicamente simples e resultar em boas taxas de desenvolvimento embrionário e nascimentos (MACLELLAN *et al.*, 2002; MUKAIDA e OKA, 2012; CURCIO *et al.*, 2014; GEBER *et al.*, 2015).

A concentração e o tempo de exposição ao crioprotetor são fatores críticos que afetam a viabilidade do ovócito. A concentração relativamente elevada de agentes crioprotetores utilizada para a vitrificação, tal como o etileno glicol (EG), o dimetil sulfóxido (DMSO), e o propilenoglicol (1, 2-propanodiol; RCB), danifica a viabilidade ovocitária através de efeitos citotóxicos e osmóticos (HUANG *et al.*, 2006). A menor exposição à solução de vitrificação é crucial de preservar adequadamente a ultraestrutura celular, garantindo assim maiores taxas maturação ovocitária até o estágio de M-II (CURCIO *et al.*, 2014).

Há divergência entre autores quando se trata da fase de maturação do ovócito no momento da vitrificação (MACLELLAN *et al.* 2010; LANGE-CONSIGLIO *et al.*, 2013; HINRICHS, 2013; CHIAN, *et al.*, 2014; CURCIO, *et al.* 2014). Em estudo realizado por Hurtt *et al.* (2000), não foi observada diferença comparando a taxa de sobrevivência em ovócitos vitrificados imaturos e maturados *in vitro* nas espécies equina e bovina. De acordo com Chang *et al.* (2011), a taxa de sobrevivência em ovócitos humanos vitrificados durante telófase I e M-II é semelhante (97% e 93%, respectivamente). Entretanto, Tharasanit *et al.* (2006) demonstraram que a vitrificação de ovócitos equinos no estado de vesícula germinativa (VG) reduz a capacidade de chegar a M-II durante maturação *in vitro* (41% VG vitrificados vs. 58% controle). Entretanto, os mesmos autores observaram que a vitrificação de ovócitos em VG resulta em melhores taxas de clivagem 48 h após a fecundação pela técnica de ICSI (34% vs. 16% para ovócitos vitrificados em VG e M-II, respectivamente). Contudo, ficou demonstrado que a simples exposição aos meios de vitrificação não altera a taxa de maturação em comparação com controle (55% vs. 58%). Além deste estudo, experimentos relatam que ovócitos humanos devem ser vitrificados em M-II após maturação *in vitro* (FASANO *et al.*, 2012; YAZDANPANAHA *et al.*, 2013).

Outro fator importante para a viabilidade celular durante o processo de criopreservação é a taxa de resfriamento utilizada na vitrificação do ovócito. Para isto, uma variedade de dispositivos empregados para armazenar as células tem sido empregada para se obter uma adequada velocidade de resfriamento. Inicialmente, métodos como *open pulled straw* (OPS) (VAJTA *et al.*, 1997; VAJTA *et al.*, 1998) e *cryoloop* (LANE *et al.*, 1999) foram utilizados para mergulhar o dispositivo diretamente em nitrogênio líquido. Subsequentemente, métodos comerciais como *Cryotop* (CHIAN *et al.*, 2004; KUWAYAMA *et al.*, 2005) e *Cryoleaf* (CHIAN *et al.*, 2005) foram desenvolvidos e



considerados capazes de obter taxa de resfriamento  $>20.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  através do contato direto com nitrogênio líquido. No entanto, o contato direto com o nitrogênio líquido tem gerado preocupação com relação a contaminação com vírus, bactérias e fungos (BIELANSKI *et al.*, 2000; BIELANSKI *et al.*, 2003; BIELANSKI & VAJTA, 2009).

O tempo de reaquecimento do ovócito após passar pelo processo de vitrificação tem grande importância na taxa de sobrevivência (MAZUR & SEKI, 2011). Em estudos realizados em camundongos, foi demonstrado que taxas de aquecimento de  $140^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a  $250^{\circ}\text{C}/\text{min}$  obtiveram sobrevivência baixa ( $<30\%$ ) em comparação com  $2200^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a  $3300^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ( $80\%$ ). Além disso, sugerem que a letalidade do aquecimento lento pós vitrificação deve-se às consequências do crescimento de pequenos cristais de gelo intracelulares por recristalização (SEKI & MAZUR, 2008; MAZUR & SEKI, 2011). Ao comparar tempos de resfriamento e aquecimento durante o processo de vitrificação, Seki & Mazur (2012) sugerem que a taxa de aquecimento seria até mais importante que a de resfriamento, indicando também que ovócitos podem ser vitrificados com sucesso utilizando uma taxa de resfriamento relativamente baixa ( $442\text{-}500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).

Recentemente, Maclellan *et al.*, (2010) obtiveram  $72\%$  de sobrevivência de ovócitos maturados *in vivo* e vitrificados, sendo que  $26\%$  dos embriões formaram vesículas embrionárias com batimentos cardíacos após ICSI e TE. Em outro estudo, foi observado que a diminuição no tempo de exposição ao agente crioprotetor preservou a ultraestrutura e alcançou melhores taxas de maturação nuclear ( $60\%$ ) (CURCIO *et al.*, 2014). Além deste, Dini *et al.* 2015, sugerem que ovócitos podem ser mantidos em solução de manutenção para embriões (*Syngro® Embryo Holding Solution*) por 18-20 h em temperatura de  $22\text{-}25^{\circ}\text{C}$  sem comprometer a competência de desenvolvimento ovocitária, obtendo  $61\%$  de M-II com 22 h de MIV.

Os conflitantes resultados encontrados em vários grupos de pesquisa utilizando diferentes espécies como modelo demonstram a necessidade de futuros entendimentos nos princípios de vitrificação levando em conta novas formas de aferir a viabilidade ovocitária pós vitrificação.

## **2.5 Marcadores de viabilidade ovocitária**

Normalmente, os CCOs coletados em abatedouros ainda não atingiram o estado pré-ovulatório e podem não ter recebido a exposição suficiente a hormônios e fatores de crescimento *in vivo* para o acúmulo de mRNA materno necessário para o

desenvolvimento *in vitro* (DIELEMAN, 2002). Durante a foliculogênese, fatores exclusivamente ou predominantemente expressos pelo ovócito são necessários para a progressão do folículo através das diferentes etapas do seu desenvolvimento (UYAR *et al.*, 2013).

Um dos primeiros fatores envolvidos é o FIG $\alpha$  (*Factor in the Germline alpha*), necessário para a formação de folículos primordiais, sendo observado em camundongos modificados geneticamente (*Knockout*) para anular a ação do FIG $\alpha$  em folículos primordiais (SOYAL *et al.*, 2000). Outro fator importante expresso no ovócito é o NOBOX (*Newborn ovary homeobox protein*), sendo ovócito específico e expresso em ovócitos de folículos primordiais e em crescimento (SUZUMORI *et al.*, 2002). Fêmeas de camundongos *NOBOX-Knockout* são inférteis e têm ovários atrofiados desprovidos de ovócitos. Ao contrário do que é observado em camundongos *FIG $\alpha$ -Knockout*, a proliferação de células germinativas e formação inicial de folículos primordiais ocorre na ausência de NOBOX. Assim, a falta de NOBOX inibe o crescimento folicular para além da fase primordial e acelera a perda de ovócitos (RAJKOVIC *et al.*, 2004).

O fator de diferenciação de crescimento-9 (*Growth Differentiation Factor 9*; GDF-9) é outro importante fator mediador da foliculogênese. O GDF-9 é produzido pelo ovócito em folículos primários até o momento da ovulação (MCPHERRON & LEE, 1993; MCGRATH *et al.*, 1995). Em camundongos *GDF-9-Knockout*, observa-se que o desenvolvimento folicular permanece sem crescimento e parado no estágio primário da foliculogênese (DONG *et al.*, 1996). Elvin *et al.* (1999), demonstrou que o GDF-9 tem um importante papel na expansão das células do cúmulo. O GDF-9 atua como um fator parácrino secretado pelo ovócito que regula enzimas celulares da granulosa envolvidas na expansão das células do cúmulo, criando assim um ótimo microambiente para a competência ovocitária (PANGAS e MATZUK, 2005).

Além disso, um homólogo ovócito específico do GDF-9, chamado de proteína óssea morfogenética 15 (*Bone Morphogenetic Protein 15*; BMP-15) foi clonada no cromossoma-X (DUBE *et al.*, 1998). Yan *et al.*, (2001), demonstraram um sinergismo entre GDF-9 e BMP-15 na foliculogênese. Camundongos *BMP-15-Knockout* são subférteis, apesar de apresentarem histologia ovariana relativamente normal (YAN *et al.*, 2001). Similar ao GDF9, BMP15 é expresso no ovócito durante todos os estágios da foliculogênese (DUBE *et al.*, 1998; LAITINEN *et al.*, 1998), sendo sua expressão alta entre folículo primário até preovulatório. A BMP15 possui papel fundamental na

regulação do desenvolvimento folicular em mamíferos (GALLOWAY *et al.*, 2000; SENDAI *et al.*, 2001) e mutações naturais neste gene podem provocar infertilidade (HANRAHAN *et al.*, 2004), sendo a manutenção da expressão de BMP15 no ovócito essencial para a eficiência da fertilidade feminina e desenvolvimento folicular adequado (LIAO *et al.*, 2003).

A Ciclooxigenase 2 (*Cyclooxygenase 2*; COX2), Gremlin 1 (GREM1), ácido hialurônico sintase 2 (HAS2) e pentraxina 3 (PTX3) são todos parte de uma cascata de genes alvo do GDF-9 encontrados nas células do cúmulus e têm sido avaliados como marcadores para competência ovocitária em humanos (CILLO *et al.*, 2007; MCKENZIE *et al.*, 2004). McKenzie *et al.*, (2004) acessaram os níveis de expressão de HAS2 e GREM1 em humanos e encontraram expressão maior em células do cúmulus envolvendo ovócitos que desenvolveram embriões de alta qualidade. Estudos subsequentes confirmaram a associação da expressão de GREM1 e desenvolvimento embrionário (CILLO *et al.*, 2007; ANDERSON *et al.*, 2009). Wathlet *et al.*, (2011) reportaram BMP e GREM1 elevado em células do cúmulus de ovócitos que resultaram em gestação em mulheres. Entretanto, HAS2 não foi associado consistentemente com desenvolvimento embrionário ou gestação (MCKENZIE *et al.*, 2004; GEBHARDT *et al.*, 2011). Portanto, a expressão de genes relacionados à competência ovocitária e embrionária vem sendo utilizado em diferentes espécies para um melhor conhecimento da viabilidade celular durante o processo de foliculogênese e fertilização. Estudos na espécie esquinha ainda são escassos e merecem uma maior atenção às informações que possam ser utilizadas para uma completa da avaliação gênica relacionada a viabilidade ovocitária.

Por outro lado, o fator pró-apoptótico da família de proteínas (*B-cell lymphoma 2*; BCL-2) controla o ponto de sobrevivência celular (YOULE & STRASSER, 2008). Além disto, outro membro das proteínas BCL-2, denominado BAX, atua como ativador da apoptose através da permeabilização da membrana externa mitocondrial, sendo expresso logo no início do processo de apoptose celular (CHENG *et al.*, 2003; MIGNARD *et al.*, 2014). Da mesma forma, porém mais adiante no processo de apoptose, a Caspase 3 (CASP 3) é uma proteína membro da família das caspases (ALNEMRI *et al.*, 1996) que por consequência da ativação sequencial das caspases tem um papel central na fase de execução da apoptose celular. Existe inicialmente como proenzimas (procaspases) as quais se mantêm inativas até que processos bioquímicos causam sua ativação (SALVESEN, 2012) resultando na morte celular.

O estudo de biomarcadores ligados à viabilidade ou apoptose celular pode auxiliar na compreensão dos fatores que atuam na viabilidade do gameta feminino após passar pelo processo de vitrificação, auxiliando na evolução da eficiência desta técnica e, conseqüentemente, na manutenção genética da espécie equina.

### **3. HIPÓTESE**

Complexo cúmulus-ovócito equino imaturo permanece viável após o processo de vitrificação.

### **4. OBJETIVOS**

Determinar a expressão de genes associados à viabilidade celular e apoptose em complexos cúmulus-ovócito equino.

Determinar por meio da expressão gênica a viabilidade de complexos cúmulus-ovócito antes e após a vitrificação.

## **CAPÍTULO II**

Artigo elaborado nas normas da revista *Theriogenology*

## GENE EXPRESSION OF EQUINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES PRIOR AND AFTER VITRIFICATION

Mauro Flores Polenz<sup>1,2,\*</sup>, Gabriel Ribas Pereira<sup>3</sup>, Geovani Celso Augusto<sup>4</sup>, Sandra Mara Fiala Rechsteiner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Graduate Program in Equine Medicine, Veterinary School, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Historep - Morphology Department, Biology Institute, Federal University of Pelotas - UFPel, Pelotas, RS, Brazil

<sup>3</sup> Center for Studies and Research in Agribusiness – CEPAN, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> In Vitro Brasil Ltda, Animal Cloning Department, Mogi Mirim, SP, Brazil

\* Corresponding author:

Rua Sete de Setembro 1051, Centro, CEP: 97400-000, São Pedro do Sul, RS, Brazil. Tel: (55) 9621 2821. Email: vetmauro@gmail.com

**ABSTRACT** - Oocyte vitrification is a modern technique that can be used to ensure genetic maintenance after animal death and to improve oocyte cryopreservation at different stages of maturation. Equine oocyte vitrification is a biotechnology rarely used in horses due to the low post-cryopreservation cell viability. The aim of this study was to determine the expression of genes linked to cell viability and apoptosis in equine cumulus-oocyte complexes (COCs) prior and after vitrification. With this purpose, 5 to 30 mm ovarian follicles were aspirated and 240 COCs were collected from a slaughterhouse in Southern Brazil during breeding season. The COCs were divided into two groups: non-vitrified control COCs (CON, n=120) and vitrified oocytes (VIT, n=120). Vitrification protocol was provided according to a commercially available method from EquiPro-VitKit. After vitrification, COCs were *in vitro* matured for 6 hours and immediately evaluated. Genes product abundance were: Bone morphogenetic protein 15 (Bmp 15); Bcl-2-associated X protein (Bax); Caspase 3 (Casp 3); and GAPDH (control). The gene expression analysis was performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Difference was observed in COCs mRNA abundance for Bax gene from non-vitrified ( $0.85 \pm 0.08$ ) compared to vitrified ( $2.05 \pm 0.47$ ;  $P = 0.03$ ). No difference

was observed in the COCs mRNA abundance for Bmp 15 from non-vitrified ( $1.55 \pm 0.73$ ) compared to vitrified ( $2.84 \pm 2.20$ ;  $P > 0.05$ ). There was no difference in mRNA abundance for Casp 3 in non-vitrified ( $0.63 \pm 0.20$ ) compared to vitrified ( $0.64 \pm 0.01$ ;  $P > 0.05$ ). In conclusion, results demonstrate that Bmp 15 expression in vitrified COCs indicate cell viability; however, Bax suggest the activation of apoptosis cascade in cells exposed to vitrification process.

*Keywords:* Assisted reproduction biotechnology, Gene expression, COCs vitrification, Equine.

## 1. Introduction

Vitrification is a hatter successful method used for cryopreservation of gametes and embryos in several species, although progress is still limited, especially in horses [1,2,3,4]. Equine embryo vitrification is now a commonly applied assisted reproductive technique (ARTs) that allows good fertility rates in the horse industry [5]. Early cleavage equine embryos can be consistently vitrified using an optimal product with similar results to slow cooling embryos [6,7]. In addition, post-thawing pregnancy rate of equine embryos subjected to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) have been in the range of 50 to 60% using vitrification method [8].

Vitrification of immature and mature equine oocytes has been performed in different research laboratories with variable results, replacing, in many cases, conventional slow cooling methodology [9,10]. Indeed, the use of new ARTs aims to achieve higher embryonic survival rates in equine species [11].

Equine oocyte vitrification allows the preservation of functional cellular structures to artificially inseminate a mare or the use in combination to ARTs, such as ICSI and cloning [9]. Therefore, vitrification technique is of fundamental importance as an option for the reproductive management of equine species. Unfortunately, little information is available on vitrification of immature equine oocytes to achieve high genetic preservation and to improve fertilization rates in this specie.

Studies of molecular biomarkers to assess equine oocyte viability or apoptosis may help to understand the factors that act on the female gamete viability after passing through the vitrification process. With this purpose, genes such as Bone Morphogenetic Protein 15 (Bmp 15) [12,13], Caspase 3 (Casp 3) [14] and Bcl-2-associated X protein (Bax) [15] are commonly used to evaluate oocyte competence in different species. Therefore, studies

on gene expression will definitely contribute to the establishment of more specific vitrification protocol for oocyte cryopreservation.

The vitrification technique prevents cellular structural alterations generated by the formation of ice crystals that occurs during conventional slow freezing. Therefore, successful vitrification depends mainly on the determination of the ideal concentration and duration of exposure to the cryoprotectant solutions to minimize cellular changes due to the vitrification process. Vitrification techniques for equine oocytes are already described and limited to the use of few different cryoprotectors to allow complete cell cryopreservation [16,17,18].

Recently, studies demonstrated that vitrification of equine oocytes preserved oocyte ultrastructural features and nuclear and cytoplasmatic maturation rates were higher for vitrified oocytes with expanded cumulus [19,20]. New methods for oocytes cryopreservation can significantly accelerate the reproductive techniques in equine [21]. The present study aimed to evaluate the changes in gene expression prior and after vitrification of equine immature cumulus-oocyte complexes (COCs).

## **2. Material and methods**

All chemicals used were purchased from Sigma Chemicals Company (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated.

### *2.1 Collection and evaluation of cumulus–oocyte complexes*

Equine ovaries were obtained from an abattoir located in São Gabriel (30°25'31.5"S and 54°22'35.6"W), Rio Grande do Sul State, Brazil during the physiological breeding season. The interval between ovary retrieval and COCs vitrification ranged from 2 to 3 h. Ovaries were collected at the slaughterhouse directly after slaughter and maintained in 0.9% NaCl solution at 25°C until follicle aspiration. The experiment was carried with 50 ovaries, from which 240 COCs were submitted to our vitrification protocol. In addition, 20 COCs were selected and submitted to *in vitro* maturation (IVM) prior (n=10) and after (n=8) vitrification to evaluate nuclear maturation status.

Equine oocytes from 5 to 30 mm diameter follicles were aspirated with an 18-G needle connected to a 20 mL syringe containing 2 mL PBS with 0.8% heparin. During aspiration, a scraping motion within the follicle was performed with the needle, to



enhance oocyte recovery. The follicular fluid was flushed in and out of the follicle two to four times to optimize the retrieval of oocytes present in each follicle. The COCs and follicular fluid from aspirated follicles were placed into 50 ml polypropylene tubes. After, follicular contents were filtered and the filter was flushed using PBS and placed in 35-mm Petri dishes to examine the contents under a stereomicroscope and to locate the COCs.

Morphology and structural integrity of each COCs were evaluated and classified as being compact (CP; having a tight, complete compact cumulus with a distinct, smooth hillock), expanded (EX; having a granular or expanded cumulus), or denuded (D; having a partial cumulus or only corona radiata present) [22,23]. Only oocytes with a compact cumulus having 3 or more cumulus cells line and homogeneous cytoplasm were used in this experiment [19]. Following morphological classification, selected COCs were washed four times in the basal medium (EquiHold®, Minitube®-Germany). Number of COCs submitted to vitrification ranged from 8 to 12 for each 200 µl drop of TQC Complete Flush (Nutricel®, Campinas, SP) at 37°C. After, COCs were immediately transferred to vitrification solution (VIT) or cultured *in vitro* (CON).

## 2.2 COCs vitrification and warming

The vitrification of COCs was performed using an EquiPro-VitKit commercial media according to ELDRIDGE-PANUSKA *et al.* [6] and NOWAK *et al.* [24]. COCs were exposed to vitrification solutions at room temperature (22-24°C). Briefly, COCs were placed in a 200 µl 1.4 M glycerol in PBS for 5 min. After, COCs were exposed to 1.4 M glycerol + 3.6 M ethylene glycol for 5 min, and then transferred into 30 µl of final vitrification solution containing 3.4 M glycerol + 4.6 M ethylene glycol. The final vitrification solution containing the COCs were loaded into a 0.25 ml, non-irradiated, polyvinyl chloride straw and separated by two air bubbles. Straw ends were loaded with two columns of 60 µl 0.5 M galactose (Gal) medium (Fig. 1). The total time to expose the COCs to the final vitrification solution and to load the COCs into the straw was less than 1 min. The straw was heat-sealed and placed for 1 min into a cooled plastic goblet 2.5 cm above the liquid nitrogen. The entire goblet containing the straw was then immersed in liquid nitrogen and stored until warming and COCs gene expression evaluation.

To warm COCs, straws were removed from the nitrogen liquid and held in air for 10 s before being immersed at 23°C water bath for 10 s. Then, contents of the straw were

expelled into a Petri dish and stirred gently to facilitate mixture of the vitrification and dilution solutions. After warming, COCs were subjected to culture *in vitro* and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis as described below.

### 2.3 Assessment of COCs maturation

The COCs were transferred to four-well culture dishes containing 200  $\mu$ l of maturation medium and cultured at 38.2°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air, for 6 h. The basic culture medium was M199 with Earle's salts, 10% FBS and 5mU/mL FSH, as described by HINRICHS *et al.* [10]. At the end of the culture period, COCs were subject to nuclear maturation assessment by exposure to 10  $\mu$ g/ml of bisbenzimidazole (Hoescht 33342) for 15 min at 38°C. After, slides were mounted, stained oocytes were classified under UV light (filter cube +A, with a wavelength of 340–380 nm) with a fluorescence microscope (Leica, DMI 4000B). Chromatin configurations of germinal vesicle (GV)-stage oocytes were classified as Fluorescent Nucleus (FN), having fluorescence throughout the nucleus; Fibrillar (F), having chromatin strands throughout the estimated area of the nucleus; Intermediate (I), having chromatin strands or irregular masses of chromatin over approximately half the estimated nuclear area; or Condensed Chromatin (CC), having chromatin condensed into one small regular or irregular mass [25,26]. According to the characteristics of the chromatin, oocytes that resumed meiosis were classified as germinal vesicle breakdown (GVBD) or Metaphase I (M-I) and described and statistically analyzed as GVBD.

### 2.4 RNA extraction and qRT-PCR

Total RNA was extracted from COCs using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were estimated using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). Absorbance 260/280 nm ratios above 1.8 were considered pure. Total RNA was treated with 0.1 U DNase (Invitrogen) at 37 °C for 5 min to digest contaminating DNA. Reverse transcriptase reactions were performed with 500 ng RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA) in a final volume of 20  $\mu$ l according to the manufacturer's protocol.

Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) reactions were performed in a CFX 384 real-time PCR detection system using iQTM SYBR Green Supermix (BioRad). Primers were designed based on equine sequences available in GenBank (Table 1) and synthesized by Sintese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brazil). Samples were run in

duplicates and the standard curve method was used to determine the abundance of mRNA for each gene, and mRNA abundance was normalized to the mean abundance of the internal control gene GAPDH. All reactions had efficiencies between 90 and 110%,  $r^2 \geq 0.98$  and slope values from -3.6 to -3.1. Dissociation curve analyses were performed to validate the specificity of the amplification products.

### 2.5 Statistical analysis

Differences in transcript levels were analyzed by multi-comparison test using LSMeans Student *t*-test. Data were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk test and normalized when necessary. Results are presented as means  $\pm$  SEM, and  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All analysis were performed using the JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC). At least three individual gene replicates were conducted for each group of evaluated COCs.

## 3. Results

A total of 80 ovaries were processed. An average of 5 oocytes were recovered per ovary, from which 240 COCs were selected and used for the vitrification study to evaluate gene expression. In addition, 20 COCs were select and submitted to *in vitro* maturation (IVM) prior (n=10) and after (n=8) vitrification to evaluate nuclear maturation status. Two COCs were lost from the experiment during manipulation. Seven out of ten (7/10; 70%) non-vitrified oocytes were found in GV state having fibrillar chromatin (Fig. 2A) and three out of ten (3/10; 30%) having intermediate chromatin configuration. Vitrified oocytes showed GV stage having condensed chromatin (7/8; 87.5%; Fig. 2B) and one having fibrillar configuration.

Difference was observed in mRNA levels of abundance for Bax gene ( $0.85 \pm 0.08$ ) in non-vitrified compared to vitrified ( $2.05 \pm 0.47$ ;  $P = 0.03$ ; Fig. 3A) COCs. No difference was observed in the mRNA expression for Bmp 15 ( $1.55 \pm 0.73$ ) in non-vitrified compared to vitrified ( $2.84 \pm 2.20$ ;  $P > 0.05$ ; Fig. 3B) COCs. There was no difference in mRNA expression of Casp 3 ( $0.63 \pm 0.20$ ), in non-vitrified compared to vitrified ( $0.64 \pm 0.01$ ;  $P > 0.05$ ; Fig. 3C) COCs.

## 4. Discussion

Bax, Casp 3 and Bmp 15 expression are detectable in equine COCs prior and after vitrification. Gene expression detection between pro-survival and pro-apoptotic factors

within the oocyte and surrounding cells is essential for follicular development and oocyte maturation. Data on equine COC's viability is of utmost importance to determine biomarkers for gamete development and competence acquisition of cell maturation. There is intense interest in developing procedures for effectively cryopreserve equine oocytes, but the results to date have not matched the interest [9]. In this work we also used a simple method to preserve equine COCs that has been used in the oocytes vitrification of other mammalian species.

Vitrification protocols showed to be effective to preserve immature oocytes in the presence of cumulus-oophorus [27,28,29]. Interestingly, Purohit *et al.* [30] demonstrated that immature cumulus compact goat oocytes better tolerate vitrification in terms of fertilization rate compared to matured vitrified oocytes. In the horse, initial cumulus morphology of equine oocytes did not affect nuclear maturation after vitrification and immature oocytes can be used after vitrification/re-warming to obtain satisfactory M-II rates after IVM [31]. Reports on equine oocyte vitrification are limited to the uses of ethylene glycol, ficoll, sucrose [32,16], in addition of trehalose [17] and dimethylsulfoxide [17,18]. Maclellan *et al.* [18] reported pregnancy and foal term birth from the fertilization of vitrified equine oocyte, similar to *in vivo* matured and fertilized by gamete intrafallopian transfer (GIFT). Indeed, additional information on immature COCs vitrification is needed to ensure potential alternatives for gamete cryopreservation and to increase fertilization rates.

The process of cryopreservation of mature and immature oocytes has several limitations, as the sensitivity of oocytes at low temperatures [33,34], and changes that promote the hardening of the zona pellucida [35]. Due to the limiting process of equine oocytes *in vitro*, cryopreservation has focused on the use of mature oocytes at M-II stage of development; however, in our study we observed that 17 out of 18 COCs had no evidence of development and were considered as immature stage. In addition, the use of immature COCs has been associated with the oocyte ability to withstand cryopreservation in goats [30].

The differential expression of the apoptotic genes is related to oocytes competence with advanced signs of atresia in different species [36,37,38,39,40]. In equine, we showed that Bax genes is expressed in the molecular events involved in communication COCs, indicating possible markers of viability and cell competence. In contrast, Leon *et al.* [38] reported no difference detected in the expression of Bax apoptotic genes analyzed in immature oocytes compared to oocyte submitted to maturation *in vitro*. In contrast, higher

expression of the pro-apoptotic gene Bax in viable COCs was observed in our study. In this study reliable information was provided to ensure that immature COCs can be vitrified and used for further ART in the horse; however, it would be interesting to analyze the apoptosis levels with the pregnancy rates and the success of development to term.

Studies of equine gamete competence are still scarce and gene expression in COCs and proteins involved in the apoptotic pathways have not been elucidated in this species. Casp 3 protein expression has been described in the equine oocytes and granulosa cells from pre-ovulatory follicles after induced ovulation but no difference in mRNA levels between young and old mares were observed [39]. To our knowledge, no previous work has quantified Casp 3 activity to identify equine immature oocyte atresia. It was found that Casp 3 activity does not increase in vitrified COCs and confirms that Casp 3, the executioner of apoptosis, is expressed in equine COCs prior and after vitrification. Thus, the Bax and Casp 3 expression profile of vitrified equine COCs can be used to predict oocyte viability and developmental competence.

The Bcl-2 gene family, which includes the Bax (proapoptotic) and Bcl-2 (anti-apoptotic) genes, is involved in the regulation of apoptosis in different cell types [41,42,43]. These two genes in particular play a key role in the occurrence of apoptosis in female germ cells [44] and are used in the analysis of apoptosis in oocytes and embryos [45,40,46]. The ratio of Bcl-2:Bax determines cell susceptibility to apoptosis; a lower ratio, and thus dominance of Bax over Bcl-2, denotes accelerated apoptosis and lower quality of oocytes and embryos [47,41]. Recently, a report showed a higher abundance in Bax expression in cumulus cells from aged mares, confirming there are age-related differences in gene expression in equine COCs, which may be associated with the lower quality and decreased developmental competence of oocytes from aged mares [48]. This study, demonstrated a higher Bax expression in COC's after vitrification procedure. Therefore, the evaluation of Bax transcripts may be used as biomarkers of the quality of the oocyte and developmental potential in the horse. The expression of Bax may be constitutive, which suggests that the oocytes are under constant threat and that their development potential depends on their capacity to inhibit pro-apoptotic activity as demonstrated in human oocytes [49].

Recently, COCs in humans showed that the expression levels of *Bmp 15* mRNAs were significantly associated with oocyte maturation, normal fertilization and cleavage rate; therefore, *Bmp 15* mRNAs in cumulus granulosa cells may be considered as new molecular markers for predicting oocyte developmental potential [50]. We determined

that Bmp 15 is present in vitrified COCs and non-vitrified, indicating that the vitrification procedure might affect the expression of genes. In addition, in bovine ovaries, Bmp 15 is also involved in the regulation of cumulus cell apoptosis and this induction can be prevented by treatment with Bmp 15 [51]. Contrary, Ebrahimi et al. [37] showed that the expression of Bmp15 gene was retarded after vitrification of sheep COCs. Thus, Bmp 15 may contribute to decreasing the incidence of apoptosis within cumulus-oocyte complexes until the point of ovulation.

Similar to GDF9, the mRNA and protein of Bmp 15 are found in oocytes during all stages of folliculogenesis. Indeed, these factors act as intraovarian regulators of primordial follicle activation, somatic cell proliferation, steroidogenesis and oocyte maturation [52]. Its expression is high between the primary to pre-ovulatory follicle stages in rodent species [53]. This indicator is in agreement with the data observed in our study, where COCs showed no expression of Bmp 15 because they have not development competence at the stage of analyzed COCs. Recently, in equine oocytes, there is a higher expression of Bmp 15 during the moment of cumulus cells expansion, which occurs after oocyte maturation 6 hours after equine growth hormone (eLH) administration [54]. In mouse oocytes, higher expression was seen in vitrification group for Bmp15 only on the 4th day of culture and decreased significantly up to the 8th day of culture [55]. This allows Bmp 15 to interact with GDF9 and coordinate the expression of the genes involved in cumulus cells expansion and proper follicular development [56], and natural mutations in these genes can provoke infertility in homozygous ewes [57].

Cumulus presence was also found to protect mature equine oocytes against vitrification-induced damage since cumulus-enclosed oocytes preserved their meiotic spindle quality [19]. In summary, the current study demonstrated that equine COCs at GV stage of development after 6 hours of maturation showed that Bmp 15 expression suggests cell viability, contrarily to Bax e Casp 3 expression that are involved in the apoptotic cascade activation observed after cryopreservation. However, it would be interesting to analyze the relationship between oocyte quality, follicle size and the apoptosis levels with fertilization rates, embryo development, pregnancy rates and the success of development to term in this species. Our findings were important to determine if different apoptotic gene studies would have similar expression on COCs prior and after vitrification to use this method for application to ART.

## 5. Conclusions

In conclusion, it was demonstrated that vitrification was a successful method for cryopreservation of immature equine COCs. We also demonstrated that Bax is higher expressed in vitrified immature equine COCs. Moreover, studies using large percentage of equine COCs provides insight for developing new strategies to improve the efficiency of vitrification to be used to produce offspring via assisted reproductive techniques.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil and thankful to Vitor Braga Rissi, Kalyne Bertolin, Werner Glazner and Professor Paulo Bayard Gonçalves for critical discussion during the collection of the data. The authors also thank Dr. Márcio Menezes Nunes (Minitube® – Brazil) for providing knowledge and material for the vitrification procedures. This research was supported by the CAPES/Brazil (Project CAPES/PNPD No. 2842/2010) and FAPERGS.

## Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## References

- [1] Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev* 2004;50:685–96.
- [2] Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan S. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertil Steril* 2005;84:36.
- [3] Hochi S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses. *J Reprod Dev* 2003;49:13–21.
- [4] Vajta G, Kuwatyma M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;65:236–44.
- [5] Stout TA. Cryopreservation of equine embryos: current state-of-the-art. *Reprod Domest Anim* 2012; 47:84–9.

- [6] Eldridge-Panuska WD, Caracciolo Di Brienza V, Seidel Jr GE, Squires EL, Carnevale EM. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* 2005;63:1308–19.
- [7] Carnevale EM. Vitrification of Equine Embryos. *Vet Clin N Am-Equine* 2006;22:831–41.
- [8] Colleoni S, Barbacini S, Necchi D, Duchi R, Lazzari G, Galli C. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. *Proc Am Assoc Equine Pract* 2007;53:554–59.
- [9] Hinrichs K. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility, and Development* 2013;25:80–93.
- [10] 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;72:1142–50.
- [11] Chenier T, Foster B, Gonzalez L, Schlaf M, Diffusion of the cryoprotectants ethylene glycol and glycerol into day 9 to 11 equine embryos: preliminary results. *Reprod fertil dev* 2015;28:151.
- [12] Galloway SM<sup>1</sup>, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosagesensitive manner. *Nat Genet* 2000;25:279–83.
- [13] Sendai Y, Itoh T, Yamashita S, Hoshi H. Molecular cloning of a cDNA encoding a bovine growth differentiation factor-9 (GDF-9) and expression of GDF-9 in bovine ovarian oocytes and in vitro-produced embryos. *Cloning* 2001;3:3–10.
- [14] Salvesen GS. "Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows". *Cell Death Differ* 2012;9:3–5.
- [15] Mignard V, Lalier L, Paris F, Vallette FM. Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis* 2014;5:1266.
- [16] Hurtt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel Jr GE, Squires EL. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 2000;54:119–28.
- [17] Maclellan LJ, Lane M, Sims MM, Squires EL. Effect of sucrose and trehalose on vitrification of equine oocytes 12 or 25 hours after onset maturariton. *Theriogenology* 2001;55:310.
- [18] Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 2002;58:911–9.



- [19] Tharasanit T, Colleoni S, Galli C, Colenbrander B, Stout TA. Protective effects of the cumulus-corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. *Reproduction* 2009;137:391–401.
- [20] Curcio BR, Gastal MO, Pereira GR, Corcini CD, Landim-Alvarenga FC, Barros SS, Nogueira CEW, Deschamps JC, Gastal EL. Ultrastructural Morphology and Nuclear Maturation Rates of Immature Equine Oocytes Vitrified with Different Solutions and Exposure Times. *J equine vet sci* 2014;34:632–40.
- [21] Canesin HS, Ortiz I, Brom-De-Luna JG, Choi YH, Hinrichs K. Mass vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2015;28:151.
- [22] Hinrichs K, Williams KA. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod* 1997;57:377–84.
- [23] Hinrichs K, Schmidt, A. Meiotic competence in horse oocytes: Interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. *Biol Reprod* 2000;62:1402–08.
- [24] Nowak A, Kochan J, Papis K, Okólski A. Studies on Survival of Horse Oocytes After rapid-I method vitrification. *J equine vet sci* 2014;34:675–79.
- [25] Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgarth JP, Martin MG. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Rep* 1993;48:363–370.
- [26] Martino NA, Dell'Aquila ME, Filioli Uranio M, Rutigliano L, Nicassio M, Lacalandra GM, Hinrichs K. Effect of holding equine oocytes in meiosis inhibitor-free medium before in vitro maturation and of holding temperature on meiotic suppression and mitochondrial energy/redox potential. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:99.
- [27] Vajta G1, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53–8.
- [28] Garg N, Purohit GN. Effect of different cryoprotectant concentrations for ultrarapid freezing of immature goat follicular oocytes on their subsequent maturation and fertilization in vitro. *Anim Reprod.* 2007;4:113–8.
- [29] Yadav RC, Sharma A, Garg N, Purohit GN. Survival of vitrified water buffalo cumulus-oocytes complexes and their subsequent development in vitro. *Bulg J Vet Med.* 2008;11(1):55–64.
- [30] Purohit GN, Meena H, Solanki K. Effects of vitrification on immature and in vitro matured, denuded and cumulus compact goat oocytes and their subsequent fertilization. *J Reprod Infertil* 2012;13:53–59.
- [31] Curcio BR, Pereira GR, Antunes LI, Boff AN, dos Santos FC, Lucas T Jr, Nogueira CE, Corcini CD, Liu I, Deschamps JC. Vitrification of equine oocytes with a polyvinyl

alcohol after in vitro maturation with equine growth hormone and insulin-like growth factor-I. *CryoLetters* 2014;35:90–4.

[32] Hochi S, Fujimoto T, Oguri N. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1995;43:236.

[33] Aman R, Parker J. Effects of cooling and rewarming on meiotic spindle and chromosome of in vitro matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994;50:103–110.

[34] Martino A, Songasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;54:1059–1069

[35] Carrol J, Depypere H, Matthews C. Freeze-thaw induced changes in the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990;90:547–53.

[36] Rao BS, Mahesh YU, Charan KV, Suman K, Sekhar N, Shivaji S. Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocyte complexes. *Cryobiology* 2012;64:176–84.

[37] Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Baharvand H, Farrokhi A. IVM and gene expression of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. *Reprod Biomed Online* 2010;20:26–34.

[38] Leon PM, Campos VF, Kaefer C, Beghini KR, McBride AJ, Dellagostin OA, Seixas FK, Deschamps JC, Collares T. Expression of apoptotic genes in immature and in vitro matured equine oocytes and cumulus cells. *Zygote* 2013;21:279–85

[39] Rodrigues BL, Silveira JC, Bruemmer JE, Bouma GJ, Carnevale EM, Clay CM. Caspase 3 Expression in Equine Granulosa Cells and Oocytes in Young and Old Mares. *Biol Reprod* 2010;83:694.

[40] Opiela J, Katska-Ksiazkiewicz L, Lipinski D, Slomski R, Bzowska M, Rynska B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology* 2008;69:546–55.

[41] Yang MY, Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim Reprod Sci* 2002;70: 159–69.

[42] Vogel M. Cell death, Bcl-2, Bax, and the cerebellum. *The Cerebellum* 2002;1:277–87.

[43] De Bem TH, Adona PR, Bressan FF, Mesquita LG, Chiaratti MR, Meirelles FV, Leal CL. The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2014;49:576–83.

- [44] Kim MR, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:205–10.
- [45] Pocar P, Nestler D, Risch M, Fischer B. Apoptosis in bovine cumulus-oocyte complexes after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during in vitro maturation. *Reproduction* 2005;130:857–68.
- [46] Jang WI, Lee SE, Choi HY, Lim JG, Heo YT, Cui XS, Kim NH. Vitrification of immature mouse oocytes by the modified-cut standard straw method. *Cell Biol Int* 2014;38:164–71.
- [47] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609–19.
- [48] Cox L, Vanderwall DK, Parkinson KC, Sweat A, Isom SC. Expression profiles of select genes in cumulus-oocyte complexes from young and aged mares. *Reprod Fertil Dev* 2015;27:914-24.
- [49] Boumela I, Assou S, Aouacheria A, Haouzi D, Dechaud H, De Vos J, Handyside A, Hamamah S. Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond. *Reproduction* 2011;141:549–61.
- [50] Li Y, Li RQ, Ou SB, Zhang NF, Ren L, Wei LN, Zhang QX, Yang DZ. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:81.
- [51] Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 2005;118:5257–68.
- [52] Knight PG, Glister C. Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 2003;78:165–83.
- [53] Otsuka F, Shimasaki S. A novel function of Bone Morphogenetic Protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology* 2002;146:4938–41.
- [54] Campos-Chillon F, Farmerie TA, Bouma GJ, Clay CM, Carnevale EM. Effects of aging on gene expression and mitochondrial DNA in the equine oocyte and follicle cells. *Reprod Fertil Dev* 2015;27:925–33.
- [55] Jamalzaei P, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Farrokhi A. Oocyte maturation and expression pattern of follicular genes during in-vitro culture of vitrified mouse pre-antral follicles. *Gene Expr Patterns* 2016; 20:63–70.

[56] Lan ZJ, Gu P, Xu X, Jackson K, Demayo FJ, O'Malley BW, Cooney AJ. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J* 2003;22:1–12.

[57] Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*ovis aries*). *Biol Reprod* 2004;70:900–9.

## List of legends

**Figure 1.** Straw containing two COCs loaded in the vitrification medium and hold with two columns galactose (Gal) medium.

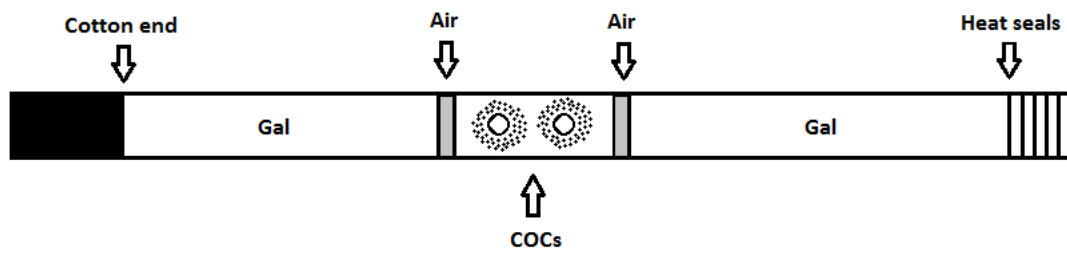
**Figure 2.** (A) Non-vitrified oocyte at the germinal vesicle (GV) stage having fibrilar chromatin configuration; (B) Vitrified oocyte at the GV stage exhibiting a tightly condensed nucleus chromatin configuration. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3.** Relative expression of Bax, BMP15, CASP3 genes in vitrified and non-vitrified COCs.

**Table 1.** Primers used in the expression analysis.

F: Forward primer; R: Reverse primer; Bmp15: Bone morphogenetic protein 15; Casp3: Caspase 3; Bax: Bcl-2-associated X protein.

Figura 1



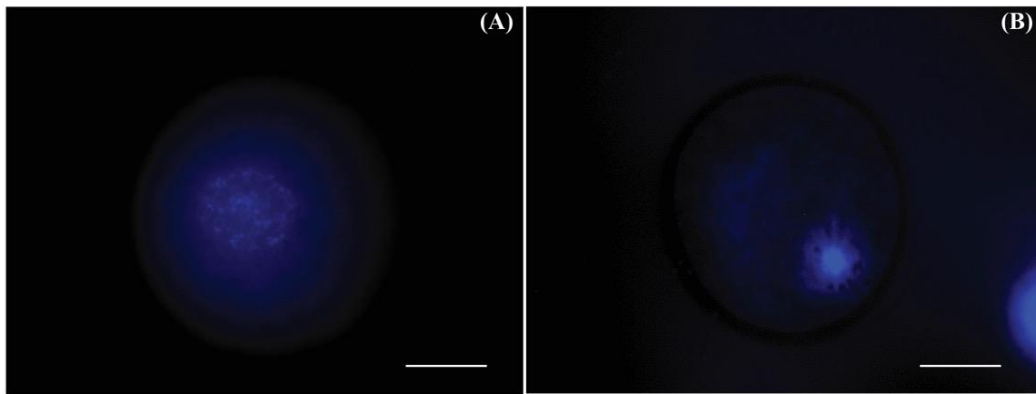
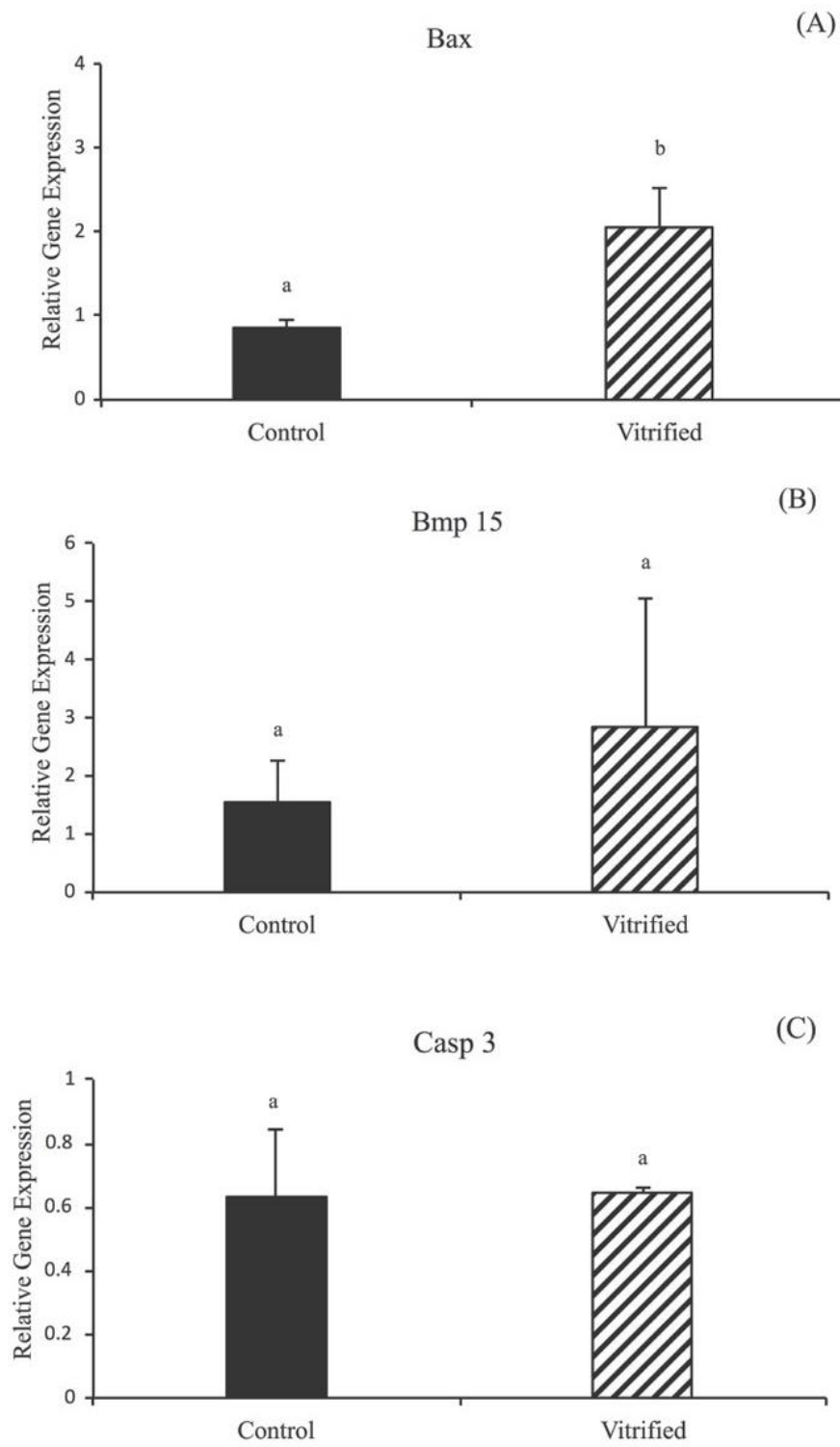
**Figura 2**

Figura 3





**Tabela 1****Table 1.** Primers used in the expression analysis.

Gene		Sequence	Ref. or accession no.
GAPDH	F	CAAGGCTGTGGGCAAGGT	NM_001163856.1
	R	GCAGGTCAGATCCACGACTGA	
Bmp15	F	TCCTAGAGAGAACCGCACCA	XM_001496223.2
	R	GGTCTGTATATGCCAGGGGC	
Casp3	F	AGGCAGACTTCCTGTATGCG	NM_001163961.1
	R	GCGACTGGATGAACCAGGAT	
Bax	F	TTCCGACGGCAACTTCAACT	XM_005596728.1
	R	GGTGACCCAAAGTCGGAGAG	

F: Forward primer; R: Reverse primer; Bmp15: Bone morphogenetic protein 15; Casp3: Caspase 3; Bax: Bcl-2-associated X protein.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1. Com base nos resultados obtidos, a vitrificação é um método que pode ser utilizado na preservação da genética feminina na espécie equina.
2. Os genes BMP15, BAX e CASP3 são expressos no ovócito equino antes e após a vitrificação, podendo ser utilizados para o auxílio no diagnóstico da viabilidade celular em estudos nesta espécie.

## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

O estudo aqui realizado evidencia a necessidade de novos experimentos para a melhor compreensão da viabilidade celular após o processo de vitrificação. Para isso, pretendemos futuramente realizar estudos relacionando o processo de maturação in vitro de ovócitos equinos com subsequente avaliação celular em diferentes tempos de maturação. Além disto, observar a relação nos níveis de abundância de RNAm para genes anti e pro-apoptóticos como BCL-2 e BAX, assim como a relação entre GDF-9 e BMP15.

Novos estudos deverão ser executados para o completo entendimento da competência ovocitária nesta espécie. Para isto, experimentos através da técnica de ICSI ou transferência nuclear após vitrificação ovocitária servirá para avaliar o desenvolvimento embrionário de fundamental importância para a obtenção de animais viáveis oriundo da técnica de vitrificação de gametas na espécie equina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, N.; SMITH, G. D. Oocyte-specific gene signaling and its regulation of mammalian reproductive potential. **Front Biosci**, v.10, p.2335–45, 2005.

ALM, H.; HINRICHS, K. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. **J. Reprod. Fertil.** v.107, p.215–220, 1996.

ALNEMRI, E. S.; LIVINGSTON, D. J.; NICHOLSON, D. W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N. A.; WONG, W. W.; YUAN, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell**, v.87, n.2, p.171, 1996.

ANDERSON, R. A.; SCIORIO, R.; KINSELL, H.; BAYNE, R. A.; THONG, K. J.; DE SOUSA, P. A. *et al.* Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. **Reproduction**, v.138, p.629–37, 2009.

ATABAY, E. C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M.; KOGA, A.; KANAI, Y. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. **Theriogenology**, v.61, p.15–23, 2004.

BACHELOT, A.; MONGET, P.; IMBERT-BOLLORÉ, P.; COSHIGANO, K.; KOPCHICK, J. J.; KELLY, P. A.; BINART, N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v.143, p.4104–12, 2002.

BÉZARD, J.; MEKARSKA, A.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Timing of in vivo maturation of equine preovulatory oocytes and competence for in vitro maturation of immature oocytes collected simultaneously. **Equine Vet J (Suppl)**, v.25, p.33–37, 1997.

BIELANSKI, A.; VAJTA, G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. **Hum Reprod**, v.24, p.2457–67, 2009.

BIELANSKI, A.; BERGERON, H.; LAU, P. C.; DEVENISH, J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.46, p.146–52, 2003.

BIELANSKI, A.; NADIN-DAVI, S. S.; SAPP, T.; LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.40, p.110–6, 2000.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J Reprod Fertil**, v.109, p.165–71, 1997.

CANESIN, H. S.; ORTIZ, I.; BROM-DE-LUNA, J. G.; CHOI, Y. H.; HINRICHS, K. Mass vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v.28, n.2, p.151, 2015.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G. B.; LIU, I. K. Influence of insulin-like growth factor- $\alpha$  and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biol Reprod**, v.65, n.3, p.899–905, 2001.

CARNEIRO, G. F.; HYDE, D.; LORENZO, P. L.; BALL, B. A. Quantification and distribution of equine oocyte CG during meiotic maturation and after activation. **Mol Reprod**, v.63, p.451–8, 2002.

CHANG, C.-C.; LIN, C.-J.; SHAPIRO, D. B.; SLAYDEN, S. M.; TIAN, X. C.; NAGY, Z. P. Telophase I oocyte vitrification. **Fertil Steril**, v.96, n.3, p.74–75, 2011.

CHEN, S. U.; LIEN, Y. R.; CHAO, K. H.; HO, H. N.; YANG, Y. S.; LEE, T. Y. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. **Mol Cell Endocrinol**, v.202, p.101–107, 2003.

CHENG, E. H.; SHEIKO, T. V.; FISHER, J. K.; CRAIGEN, W. J.; KORSMEYER, S. J. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. **Science**, v.301, p.513–517, 2003.

CHENIER, T.; FOSTER, B.; GONZALEZ, L.; SCHLAF, M. Diffusion of the cryoprotectants ethylene glycol and glycerol into day 9 to 11 equine embryos: preliminary results. **Reprod Fertil Dev**, v.28, n.2, p.151. 2015.

CHIAN, R-C.; KUWAYAMAM, TAN, L. *et al.* High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **J Reprod Dev**, v.50, p.685–96, 2004.

CHIAN, R-C.; SON, W. Y.; HUANG, *et al.* High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. **Fertil Steril**, v.84, p.36. 2005.

CHIAN, R-C.; WANG, Y.; LI, Y-R. Oocyte vitrification: advances, progress and future goals. **J Assist Reprod Genet**, v.31, p.411–420, 2014.

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

CHOI, Y. H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Reproduction**, v.127, p.187–194, 2004.

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

CHOI, Y. H., LOVE, L. B., VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. **Anim. Reprod. Sci.** v.102, p.38–47, 2007.

CHOI, Y. H.; SHIN, T.; LOVE, C. C.; JOHNSON, C.; VARNER, D. D.; WESTHUSIN, M. E.; HINRICHS, K. Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence, and subsequent fusion and activation rates after nuclear transfer. **Theriogenology**, v.57, p.1005–1011, 2002.

CILLO, F.; BREVINI, T. A.; ANTONINI, S.; PAFFONI, A.; RAGNI, G.; GANDOLFI, F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. **Reproduction**, v.134, p.645–50, 2007.

CLARK, N. A.; SWAIN, J. E. Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. **J Assist Reprod Genet**, v.30, p.865–75, 2013.

COBO, A.; MESEGUER, M.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. **Hum Reprod**, v.25, p.2239–46, 2010.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. Effect of 1,2– propanediol versus 1,2–ethanediol on subsequent oocyte maturation, spindle integrity, fertilization, and embryo development *in vitro* in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.71, p.598–604, 2004.

CURCIO, B. R. GASTAL, M. O.; PEREIRA, G. R.; CORCINI, C. D.; LANDIM–ALVARENGA, *et al.* Ultrastructural Morphology and Nuclear Maturation Rates of Immature Equine Oocytes Vitrified with Different Solutions and Exposure Times. **j equine vet sci**, v.34, p.632–640, 2014.

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CIBELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Mol Reprod**, v.45, p.521–34, 1996.

DEKEL, N.; GAKLIANI, D.; BEERS, W. Induction of maturation in follicle–enclosed oocytes: the response to gonatropins at different stages of follicular development. **Biol Reprod**, v.38, p.517–521, 1988.

DELL'AQUILA, M. E.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G. M.; MARITATO, F. In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. **Theriogenology**, v.45, p.547–560, 1996.

DELL'AQUILA, M. E.; MASTERSON, M.; MARITATO, F.; HINRICHS, K. Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after ICSI of equine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v.60, p.79–88, 2001.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCK, C. *et al.* Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p.5–20, 2002.

DINI, P.; BOGADO, O.; SMITS, K.; VANSOOM, A.; DAELS, P. Maturation kinetics after holding equine oocytes in Embryo holding medium. **Reprod Fertil Dev**, v.28, n.2, p.235–236, 2015.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor–9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v.383, p.531–535, 1996.

DRIANCOURT, M. A.; PALMER, E. Time of ovarian follicular recruitment in cyclic pony mares. **Theriogenology**, v.21, p.591–600, 1984.

DUBE, J. L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K. M.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. **Mol Endocrinol**, v.12, p.1809–1817, 1998.

DUCIBELLA, T.; KURASAWA, S.; DUFFY, P.; KOPF, G. S.; SCHULTZ, R. M. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis & zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. **Biol Reprod**, v.48, p.1251–7, 1993.

DURLINGER, A. L. L.; VISSER, J. A.; THEMME, A. P. N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. **Reproduction**, v.124, p.601–9, 2002.

EDDY, E. M.; CLARK, J. M.; GONG, D.; FENDERSON, B. A. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. **Gamete Res**, v.4, p.333–62, 1981.

ELDRIDGE-PANUSKA, W. D.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; SEIDEL, G. E. JR.; SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1308–1319, 2005.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T.; WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M. Paracrine actions of growth differentiation factor–9 in the mammalian ovary. **Mol Endocrinol**, v.13, p.1035–1048, 1999.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. **Mol Cell Endocrinol**, v.159, p.1–5, 2000.

EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reprod Fertil**, v.8, p.485–489, 1996.

FASANO, G.; DEMEESTERE, I.; ENGLERT, Y. In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification? **J Assist Reprod Genet**. v.29, p.507–12, 2012.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and

biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836–48, 2009.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.135–163, 2003.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P. E.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S. *et al.* Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosagesensitive manner. **Nat Genet**, v.25, p.279–83, 2000.

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

GEBER, S.; GEBER, G.; CAPANEMA, M. M.; SAMPAIO, M. Female fertility preservation using oocyte vitrification: 7 years experience. **Hum Reprod**, v.30, n.1, p.323–323, 2015.

GEBHARDT, K. M.; FEIL, D. K.; DUNNING, K. R.; LANE, M.; RUSSELL, D. L. Human cumulus cell gene expression. as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. **Fertil Steril**, v.96, p.47–52, 2011.

GINTHER, O. J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos, and type of embryos fixation in mares. **Jour Equi Vet Sci**, v.7, p.82–88, 1987.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.239–257, 2003.

GINTHER, O. J., BERGFELT, D. R. Association between FSH concentration and major and minor follicular waves in pregnant mares. **Theriogenology**, v.38, p.807–821, 1992.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; MEIRA, C.; KOT, K. *In vivo* effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor I on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biol Reprod**, v.70, p.99–105, 2004.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; SIDDIQUI, M. A. R.; BEG, M. A. Relationship of follicle vs oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. **Biol Reprod**, v.77, n.2, p.202–8, 2007.

GINTHER, O. J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **J Reprod Fertil**, v.90, p.311–320, 1989

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim Reprod Sci**, v.60, p.61–79, 2000.

GOUDET, G.; BÉZARD, J.; BELIN, F.; DUCHAMP, G.; PALMER, E.; GÉRARD, N. Oocyte competence for in vitro maturation is associated with histone H1 kinase activity

and is influenced by estrous cycle stage in the mare. **Biol of Reprod**, v.59, p.456–462, 1998.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprod Anim**, São Paulo: Ed. Manole, p.21–58, 1995.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*ovis aries*). **Biol Reprod**, v.70, n.4, p.900–9, 2004.

HARTSHORNE, G. M.; SARGENT, I. L.; BARLOW, D. H. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to folliclestimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine **Hum. Reprod**, v.9, p.1003–12, 1994.

HAYASHI M, MCGEE EA, MIN G, KLEIN C, ROSE UM, VAN DUIN M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, v.140, p.1236–44, 1999.

HINRICHS, K.; SCHMIDT, A. L.; FRIEDMAN, P. P.; SELGRATH, J. P.; MARTIN, M. G. *In vitro* maturation of horse oocytes characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biol Reprod**, v.48, p.363–370, 1993

HINRICHS, K.; MATTHEWS, G. L.; FREEMAN, D. A.; TORELLO, E. M. Oocyte transfer in mares. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, v.212, p.982–986, 1998.

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

HINRICHS, K. The Equine Oocyte: Factors Affecting Meiotic and Developmental Competence. **Mol Reprod**, v.77, p.651–661, 2010.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. H.; NORRIS, J. D.; LOVE, L. B.; BEDFORD-GUAUS, S. J.; HARTMAN, D. L.; VELEZ, I. C. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. **J.Am.Vet.Med.Assoc.** v.241, inpress, 2012.

HINRICHS, K., Assisted reproduction techniques in the horse. **Reprod Fertil Dev**, v.25, p.80–93. 2013.

HINRICHS, K.; BETSCHAT, R. W.; MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Effect of timing of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in mares. **J. Reprod. Fertil.** v.56, v.493–498, 2000.



HINRICHS, K.; SCHMIDT, A. L. Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. **Biol. Reprod**, v.62, p.1402–1408, 2000.

HINRICHS, K.; WILLIAMS, K. A. Relationships among oocyte–cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biol Reprod**, v.57, p.377–84, 1997.

HUANG, J.; TAN, S. L.; CHIAN, R. C. Fertility preservation for female. **J Reprod Contracep**, v.17, p.109–28, 2006.

HURTT, A. E.; LANDIM–ALVARENGA, F.; SEIDEL, G. E. Jr.; SQUIRES, E. L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open–pulled straws. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.119–128, 2000.

JACOBSON, C. C.; CHOI, Y. H.; HAYDEN, S. S.; HINRICHS, K. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.73, p.1116–1126, 2010.

JIAO, Z. X.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; Age–associated alteration of oocyte–specific gene expression in polar bodies potential markers of oocyte competence. **Fertility & Sterility**, v.98, p.480–486, 2012.

JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.185–201, 2003.

JONES, A.; VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; TOLEDO, A. A. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. **Human Reproduction**, v.19, p.1861–1866, 2004.

KASAI, M.; ZHU, S. E.; PEDRO, P. B. *et al.* Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v.33, p.459–64, 1996.

KENNEY, R. M.; CONDON, W.; GARJAN, V. K.; CHANNING, C. P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their stage of viability or atresia. **J Reprod Fertil**, v.27, p.163–171, 1979.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.11, p.300–8, 2005.

LAITINEN, M.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; KETOLA, I.; AALTONEN, J.; LEHTONEN, E.; HEIKINHEIMO, M.; RITVOS, O. A novel growth differentiation factor–9 (GDF–9) related factor is co–expressed with GDF–9 in mouse oocytes during folliculogenesis. **Mech Dev**, v.78, p.135–140, 1998.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container–less technique. **Fertil Steril**, v.72, p.1073–8, 1999.

LANGE–CONSIGLIO, *et al.* Follicular fluid leptin concentrations and expression of leptin and leptin receptor in the equine ovary and *in vitro*–matured oocyte with reference to pubertal development and breeds. **Reprod Fertil Dev**, v.25, p.837–846, 2013.

LI, X.; MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. **J Reprod Fertil**, v.119, p.253–260, 2000.

LIAO, W. X.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S.; Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of Bone Morphogenetic Protein–15 (BMP–15) and Growth and Differentiation Factor–9. **J Biol Chem**, v.278, p.3713–3719, 2003.

LINDBLOOM, S. M.; FARMERIE, T. A.; CLAY, C. M.; SEIDEL JR., G. E.; CARNEVALE, E. M. Potential involvement of EGF–like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. **Anim Reprod Sci**, v.103, p.187–192, 2008.

LORENZO, P.; LIU, I.; ILLERA, J.; PICAZO, R.; CARNEIRO, G.; ILLERA, M.; CONLEY, A.; ENDERS, A.; ILLERA, M. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine–kinase pathway. **J Physiol Biochem**, v.57, p.15–22, 2001.

LUNA, H. S. *et al.* Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.23–28, 2001.

MARA, L.; CASU, S.; CARTA, A.; DATTENA, M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. **Anim Reprod Sci** v.138, p.25–38, 2013.

MCGRATH, S. A.; ESQUELA, A. F.; LEE, S. J. Oocyte–specific expression of growth/differentiation factor–9. **Mol Endocrinol**, v.9, p.131–136, 1995.

MACLELLAN, L. J.; CARNEVALE, E. M.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; SCOGGIN, C. F.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super stimulated and non–stimulated mares. **Theriogenology**, v.58, p.911–9, 2002.

MACLELLAN, L. J.; STOKES, J. E.; PREIS, K. A.; MCCUE, P. M.; CARNEVALE, E. M. Vitrification, warming, ICSI and transfer of equine oocytes matured *in vivo*. **Anim Reprod Sci**, v.121, p.260–261, 2010.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. GDF–3 and GDF–9: two new members of the transforming growth factor beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. **J Biol Chem**, v.268, p.3444–3449, 1993.

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

MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reprod Nutr Dev**, v.43, p.325–30, 2003.

MAZUR, P.; SEKI S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to  $-196^{\circ}\text{C}$  at  $95^{\circ}$  to  $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and warmed at  $610^{\circ}$  to  $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ : A new paradigm for cryopreservation by vitrification. **Cryobiology**, v.62, p.1–7, 2011.

MCKENZIE, L. J.; PANGAS, S. A.; CARSON, S. A.; KOVANCI, E.; CISNEROS, P.; BUSTER, J. E. *et al.* Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Hum Reprod**, v.19, p.2869–74, 2004.

MCNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; FIDLER, A. E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A. *et al.* Control of early ovarian follicular development. **J Reprod Fertil**, v.54, p.3–16, 1999.

MIGNARD, V.; LALIER, L.; PARIS, F.; VALLETTE, F. M. Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. **Cell Death Dis**, v.5, n.5, p.1266, 2014.

MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; HELD, E.; RINGS, F.; GHANEM, N.; SALILEW-WONDIM, D.; TESFAYE, D. *et al.* Developmental competence of equine oocytes: impacts of zona pellucida birefringence and maternally derived transcript expression. **Reprod Fertil Dev**, v.26, n.3, p.441–452, 2013.

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v.47, p.3–12, 1997.

MUKAIDA, T.; OKA, C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.26, p.789–803, 2012.

NAVOT, D. ; BERGH, R. A. ; WILLIAMS, M. A. ; GARRISI, G. J. ; GUZMAN, I. ; SANDLER, B. ; GRUNFELD, L. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. **The Lancet**, v.337, p.1375–1377, 1991.

OGUSHI, S.; PALMIERI, C.; FULKA, H.; SAITOU, M.; MIYANO, T.; FULKA, J. JR. The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. **Science**, v.319, p.613–6, 2008

PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v.13, p.203–216, 1980.

PALMER, E.; DUCHAMP, G.; B\_EZARD, J.; MAGISTRINI, M.; KING, W.A.; BOUSQUET, D.; BETTERIDGE, K. J. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. **J Reprod Fertil**, v.35, p.689–690, 1987.

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

PARK, S. E.; SON, W. Y.; LEE, S. H.; LEE, K. A.; KO, J. J.; CHA, K. Y. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. **Fertility and Sterility**, v.68, p.920–926, 1997.

PEPLING, M. E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis**, v.44, p.622–32, 2006.

PEREIRA, G. R. *et al.* (a). The involvement of growth hormone in equine oocyte maturation, receptor localization and steroid production by cumulus-oocyte complexes in vitro. **Res Vet Sci**, v.95, p.667–674, 2013.

PEREIRA, G. R. *et al.* (b). Influence of equine growth hormone, insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and cytoskeleton morphology in equine oocytes. **Animal**, v.7:9, p.1493–1499, 2013.

PEREIRA, G. R. *et al.* The effect of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on in vitro maturation of equine oocytes. **Zygote**, v.20, p.353–360, 2012.

PERRY, G. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newslett**, v.33, p.14–26, 2015.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, p.193–210, 2001.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol Cell Endocrinol**, v.145, p.27–37, 1998.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare. **Anim Reprod Sci**, v.14, p.219–231, 1987.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: McKinnon AO, Voss JL. (Ed.). Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.161–171.

RAJKOVIC, A.; PANGAS, S. A.; BALLOW, D.; SUZUMORI, N.; MATZUK, M. M. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. **Science**, v.305, p.1157–1159, 2004.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. **Nature**, v.313, p.573–5, 1985.

RAMBAGS, B. P. B.; VAN BOXTEL, D. C. J.; THARASANIT, T.; LENSTRA, J. A.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T. A. E. Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.81, p.959–965, 2014.

RHO, G. J.; KIM, S.; YOO, J. G.; BALASUBRAMANIAN, S.; LEE, H. J.; CHOE, S. Y. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. **Mol Reprod Develop**, v.63, p.464–470, 2002.

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

RIENZI, L.; VAJTA, G.; UBALDI, F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. **Hum Reprod Update**, v.17, p.34–45, 2011.

SALVESEN, G. S. "Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows". **Cell Death Differ**, v.9, n.1, p.3–5, 2012.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**, p.1896–1912, 2012.

SAUNDERS, K. M.; PARKS, J. E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.61, p.178–87, 1999.

SEKI, S.; MAZUR, P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. **Biol Reprod**, v.79, p.727–37, 2008.

SEKI, S.; MAZUR, P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. **Cryobiology**, v.59, p.75–82, 2009.

SEKI, S.; MAZUR, P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$  in dilutions of a standard vitrification solution. **PLoS One**, v.7, p.605–8, 2012.

SENDAI, Y.; ITOH, T.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Molecular cloning of a cDNA encoding a bovine growth differentiation factor-9 (GDF-9) and expression of GDF-9 in bovine ovarian oocytes and in vitro-produced embryos. **Cloning**, v.3, p.3–10, 2001.

SIDDIQUI, M. A. R.; GASTAL, E. L.; JU, J. C.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Nuclear Configuration, Spindle Morphology and Cytoskeletal Organization of In Vivo Maturing Horse Oocytes. **Reprod Domestic Anim**, v.44, n.3, p.435–440, 2009.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126–36, 2006.

SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. Fig  $\alpha$ , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. **Development**, v.127, p.4645–55, 2000.

SUZUMORI, N.; YAN, C.; MATZUK, M. M.; RAJKOVIC, A. Nobox is a homeobox–encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. **Mech Dev**, v.111, p.137–141, 2002.

THARASANIT, T. *et al.* Developmental competence of equine oocytes vitrified at different stages of maturation. **Anim Reprod Sci**, v.94, p.291–293, 2006.

TREMOLEDA, J. L.; SCHOEVERS, E. J.; STOUT, T. A. E., COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Organisation of the cytoskeleton during in vitro maturation of horse oocytes. **Mol Reprod Dev**, v.60, p.260–269, 2001.

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

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H.; Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. **Acta Vet Scand**, v.38, p.349–52, 1997.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod**, v.51, p.53–8, 1998.

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Hum Reprod Update**, v.6, p.457–74, 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717–51, 2005.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. In–vivo and in–vitro development of pre antral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73–82, 1997.

VENDOLA, K. A.; ZHOU, J.; ADESANYA, O. O.; WEIL, S. J.; BONDY, C. A. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. **J Clin Invest**, v.101, p.2622–9, 1998.

WATHLET, S.; ADRIAENSSENS, T.; SEGERS, I.; VERHEYEN, G.; VAN DE VELDE, H.; COUCKE, W. *et al.* Cumulus cell gene expression predicts better cleavage–stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. **Hum Reprod**, v.26, p.1035–51, 2011.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulation follicular recruitment and selection. **J Reprod Fertil Suppl**, v.54, p.33–48, 1999.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C. *et al.* Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Mol Endocrinol**, v.15, p.854–866, 2001.

YAZDANPANA, F.; KHALILI, M. A.; EFTEKHAR, M.; KARIMI, H. The effect of vitrification on maturation and viability capacities of immature human oocytes. **Arch Gynecol Obstet**, v.288, p.439–44, 2013.

YING, Y.; QI, X.; ZHAO, G–Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP–4 and BMP–8b signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.14, p.7858–7862, 2001.

YOULE, R. L.; STRASSER, A. The BCL–2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, p.47–59, 2008.

ZACZEK D1, HAMMOND J, SUEN L, WANDJI S, SERVICE D, BARTKE A, CHANDRASHEKAR V, COSCHIGANO K, KOPCHICK J. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. **Biol Reprod**, v.67, p.1115–24, 2002.

ZHANG, J. J.; MUZS, L. Z.; BOYLE, M. S. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured in vitro. **Mol. Reprod**, v.26, p.361–365, 1990.