

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

JASMINE BANTIM DE SOUZA PINHEIRO

EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE *COASTING* NA QUANTIDADE E  
QUALIDADE DE OÓCITOS OVINOS

NITERÓI  
2022

JASMINE BANTIM DE SOUZA PINHEIRO

EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE *COASTING* NA QUANTIDADE E  
QUALIDADE DE OÓCITOS OVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan

Coorientador: Dr. Lucas Machado Figueira

NITERÓI, RJ

2022

JASMINE BANTIM DE SOUZA PINHEIRO

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE *COASTING* NA QUANTIDADE E  
QUALIDADE DE OÓCITOS OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joanna Gonçalves de Souza-Fabjan – UFF  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margot Alves Nunes Dode - EMBRAPA

---

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão - UFF

Niterói

2022

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à minha orientadora que, acima de tudo, é referência e inspiração. A Joanna é aquele tipo de pessoa que todos gostam e querem por perto, aquele tipo de orientadora que te ajuda, mas, ao mesmo tempo, te deixa pensar e agir por conta própria, o que te faz realmente aprender. No nosso primeiro contato, já pedi estágio e fui acolhida. Aprendi muito. Me orientou na reta final da graduação e eu não poderia ter pedido a outra pessoa para exercer esse papel. Na minha defesa do TCC, estava presente me acalmando e incentivando, e falando bem de mim, amém. Me aceitou como mestrande e o medo de decepcionar essa mulher que passei a tomar como referência, era e ainda é muito grande. Mas sigo dando o meu melhor na esperança de ser 10% do que ela é. Concluo mais essa etapa da minha vida e ela tem um papel fundamental nisso. Obrigada pela pessoa e profissional que você é para mim, para os seus outros orientados e para qualquer um que peça por sua ajuda. A gente chora por 18 h, mas ri por muito mais. Fique tranquila.

Agradeço ao meu coorientador, Lucas Figueira, por todo o apoio durante a realização do meu experimento e escrita, por me aguentar perguntando setenta vezes a mesma coisa e, ainda assim, confundindo tudo com a minha memória curta, por me salvar nas análises de ultrassonografia e estatística, além de todo o encorajamento e ensinamentos. Quem faz o ultrassom das ovelhas do experimento merece todo o agradecimento possível!

Agradeço à minha família e meus amigos, que estão sempre ao meu lado e entendem que às vezes “eu não posso, porque tenho reunião/ porque ainda não terminei de escrever o artigo/ porque meu prazo é amanhã/ porque já passei 10 dias do meu prazo”. Obrigada por fazerem a caminhada até aqui mais leve e por sempre acreditarem que eu sou capaz, as vezes até por mim. Agradeço especialmente à minha mãe, Cristina, ao meu pai, Ailton, e à minha irmã, Juliana. Amo vocês incondicionalmente e agradeço por vocês serem meu tudo.

Agradeço ao professor Felipe Zandonadi, que muito pacientemente me ajudou na organização do pré-experimento na fazenda e me deu incontáveis caronas, sempre tirando minhas milhões de dúvidas. Ao professor convidado Felipe Pereira, que se

encaixou nessa equipe como uma luva, com sua maneira de ser tão leve que combinou muito com a nossa. Ao professor Fabio Ascoli, que aceitou nos ajudar com a maior boa vontade do mundo e que alegrou nossos dias com seu jeito de ser, que soltou os cachorros mais amados do Brasil e fez a alegria dos mestrandos exaustos da fazenda. Ao professor Wagner e ao Mário, por sempre nos receberem muito bem na fazenda e ajudar no que for necessário, sempre muito prestativos.

Agradeço à dona Silvinha e Lu, por todas as conversas, cuidado e carinho. Vocês são a alma daquela fazenda e fico muito feliz toda vez que volto lá pois tenho a oportunidade de tomar um café com Salsicha e Linguíça de novo! Agradeço também aos demais funcionários da fazenda, que fazem o possível para nos ajudar enquanto “tacamos o terror” por lá.

Obrigada, Ríbrío, pelas análises da expressão gênica, pelas idas ao mercado, pelo “pagamento” pela minha colaboração depois de dias trabalhando desde muito cedo até muito tarde no laboratório, pelas vídeo-chamadas de socorro que você aceitou fazer e pelo encorajamento que você me deu durante esse período trabalhando juntos. Obrigada, Lucas Correia, por me socorrer desde o mais básico até as coisas mais complicadas, pelas inúmeras vídeo-chamadas, às vezes no mesmo dia, para me ensinar a usar algum programa, por me ajudar no experimento e nas minhas análises. Obrigada, Paulo Victor, pela ajuda no experimento, pelas piadas de tiozão que só eu rio, pela ajuda nos meus testes e pela convivência desde a graduação e, agora, no laboratório. Obrigada, Vivi, pela ajuda no experimento, na escrita, pelas conversas doidas e pelas suas quedas mais maravilhosas que vão ficar sempre na minha memória. Obrigada, Thais Oliveira, pela ajuda no experimento, por me escutar reclamando e surtando, por me acolher, pelas conversas sobre tudo e por ser a minha irmã gêmea de mestrado. Amo a nossa amizade e sei que, sem ela, esse mestrado teria sido bem mais difícil. Obrigada, Gabi Leal, por fazer meus meios e me dar os melhores conselhos, sempre um ombro amigo para me confortar e cantar “vai, mestranda”.

Muito obrigada a todos os mestrandos/doutorandos/pós-doutorandos/graduandos do laboratório. Um time como o nosso pode e está realizando coisas incríveis, principalmente porque cada um apoia e colabora com o outro. A participação de vocês foi

essencial e sou eternamente grata a cada um. O meu experimento foi a coisa mais maravilhosa do mundo porque vocês estavam lá para me ajudar.

Agradeço aos meus professores e à Universidade. Obrigada pelos ensinamentos e oportunidades dadas. Obrigada, UFF, pela experiência que vivi ao longo de sete anos, ainda mais intensa nesses dois últimos.

Agradeço, por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo financiamento deste estudo (E-26/010.001471/2019) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por proporcionar a minha bolsa durante o mestrado.

## RESUMO

A obtenção de oócitos para produção *in vitro* de embriões (PIVE) em fêmeas vivas pode ser otimizada por meio do uso de protocolos hormonais, que além de incrementar o número de oócitos disponíveis para aspiração, podem melhorar a competência ao desenvolvimento dependendo da dose, do momento da administração e tempo decorrido entre a última dose e aspiração dos oócitos (*coasting*). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes tempos de *coasting* na quantidade e na qualidade de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) em ovelhas. Foi utilizado o “protocolo Dia 0” para a sincronização da ovulação e da emergência da onda folicular em 36 ovelhas da raça Santa Inês. A mesma estratégia de estimulação ovariana (80 mg de FSH em três doses decrescentes, administradas a cada 12 h) foi realizada para todos os grupos, variando apenas o tempo (12, 36, 60 h) entre a última dose de FSH e a coleta laparoscópica dos CCOs (*coasting time*). Após seleção dos CCOs, esses foram corados com o azul cresil brilhante e avaliados quanto ao grau de condensação da cromatina da vesícula germinativa, além de medidos para verificar seu diâmetro. Posteriormente, os CCOs foram alocados em *pools* de acordo com cada tempo de *coasting* para avaliação da expressão dos genes que predizem a competência ao desenvolvimento do oócito (*MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15*, *PTGS2*, *HAS2*), e de apoptose (*BAX* e *BCL2*). A morfologia dos CCOs foi similar ( $P>0,05$ ) entre os grupos, assim como a quantidade de CCOs BCB+. O grupo G60 apresentou maior ( $P<0,05$ ) quantidade de folículos grandes, acima de 5 mm, em relação aos demais grupos, além de oócitos de diâmetro maior em relação ao grupo G12. Na avaliação da condensação da cromatina da vesícula germinativa não houve diferença entre os grupos em relação ao padrão de cromatina condensada ao redor do nucléolo (SN) ( $P>0,05$ ). Porém, o grupo G60 obteve menor taxa de condensação da cromatina tipo difusa (NSN) e maior do tipo condensada ao redor do nucléolo e envelope nuclear (SNE) em relação aos demais grupos ( $P<0,05$ ), apresentando uma configuração melhor do padrão de condensação da cromatina. Na expressão gênica, o grupo G60 apresentou melhor ( $P<0,05$ ) expressão dos genes *BMP15*, *MATER*, *ZAR1* e *PTGS2* comparado ao G12 e *PTGS2* e *HAS2* comparado ao G36. Conclui-se que o tempo de *coasting* afeta a competência ao desenvolvimento dos oócitos ovinos de fêmeas superestimuladas após protocolo de Dia 0, sendo, dentre os tempos testados nesse estudo, o de 60 h o mais adequado.

**Palavras-chave:** BCB, CCO, FSH, expressão gênica, ovelha, qualidade oocitária.

## ABSTRACT

Obtaining oocytes for *in vitro* embryo production (IVEP) in live females can be optimized through the use of hormonal protocols, that in addition to increasing the number of oocytes available for aspiration, may improve developmental competence depending on dose, timing of administration and time elapsed between last dose and oocyte aspiration (coasting). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of different coasting times on the quantity and quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) in sheep. The “Day 0 protocol” was used to synchronize ovulation and follicular wave emergence in 36 Santa Inês ewes. The same strategy of ovarian stimulation (80 mg of FSH in three decreasing doses, administered every 12 h) was performed in all groups, varying only the time (12, 36, 60 h) between the last dose of FSH and laparoscopic collection of COCs (coasting time). After COC selection, they were stained with brilliant cresyl blue and evaluated for the degree of condensation of the chromatin of the germinal vesicle, in addition to being measured to verify their diameter. Later, the COCs were allocated in pools according to each coasting time to evaluate the expression of genes predicting oocyte developmental competence (MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, PTGS2, HAS2), and of apoptosis (BAX and BCL2). COCs morphology was similar ( $P>0.05$ ) among groups, as well as the quantity of BCB+ COCS. The oocytes in G60 group had more ( $P<0.05$ ) large follicles, i.e., greater than 5 mm, in relation to the two other groups, and oocytes with a larger diameter than the G12 group. In the evaluation of the chromatin condensation of the germinal vesicle, there was no difference among the groups in relation to the SN pattern ( $P>0.05$ ). However, the G60 group had a lower NSN-type chromatin condensation rate and a higher SNE-type chromatin condensation rate compared to the other groups ( $P>0.05$ ), presenting a better configuration of chromatin condensation pattern. The analysis of the gene expression of the G60 group showed greater expression of the BMP15, MATER, ZAR1, PTGS2 genes when compared to G12, PTGS2 and HAS2 when compared to G36. It is concluded that coasting time affect the developmental competence of sheep oocytes from superstimulated females after Day 0 protocol, being, among the times tested in this study, the 60 h the most appropriate.

**Key words:** BCB, COC, FSH, gene expression, oocyte quality, sheep.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO, p. 15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, p. 18
  - 2.1 ESPÉCIE OVINA E RAÇA SANTA INÊS, p. 18
  - 2.2 O FOLÍCULO ANTRAL, p. 19
  - 2.3 AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA, p. 21
  - 2.4 GENES ENVOLVIDOS NA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA, p. 22
  - 2.5 *COASTING TIME*, p. 24
  - 2.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA, p. 27
3. OBJETIVOS, p. 31
  - 3.1 OBJETIVO GERAL, p. 31
  - 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 31
4. MATERIAL E MÉTODOS, p. 32
  - 4.1 ÉTICA, p. 32
  - 4.2 LOCALIZAÇÃO, p. 32
  - 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL, p. 32
    - 4.3.1 *Animais*, p. 32
    - 4.3.2 *Protocolo de sincronização de estro*, p. 32
    - 4.3.3 *Protocolo de superestimulação ovariana*, p. 33
  - 4.4 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS, p. 33
  - 4.5 LAPAROSCOPIA E COLETA DE CCOS, p. 34
  - 4.6 SELEÇÃO DOS OÓCITOS COMPETENTES POR MEIO DO TESTE DO BCB, p. 37
  - 4.7 AVALIAÇÃO DOS GRAUS DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA DA VESÍCULA GERMINATIVA, p. 37
  - 4.8 MENSURAÇÃO DO DIÂMETRO DO OÓCITO, p. 38
  - 4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA, p. 39

- 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 41
- 5. RESULTADOS, p. 43
  - 5.1 POPULAÇÃO FOLICULAR, p. 43
  - 5.2 COLETA E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE CCOS, p. 44
  - 5.3 TESTE DO BCB, p. 45
  - 5.4 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA DA VESÍCULA GERMINATIVA, p. 46
  - 5.5 MENSURAÇÃO DO DIÂMETRO DO OÓCITO, p. 47
  - 5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA, p. 48
- 6. DISCUSSÃO, p. 50
- 7. CONCLUSÃO, p. 56
- 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 57
- 9. ANEXO, p. 71

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. A figura ilustra a sincronização do estro e da emergência de onda folicular em ovelhas pelo “protocolo dia 0”, momento em que a estimulação ovariana é iniciada. O mesmo protocolo hormonal foi utilizado em cada grupo (G12, G36 e G60), variando apenas o *coasting time*, p. 34
- Figura 2. Padrões de condensação da cromatina da vesícula germinativa em ovinos. A – Padrão de cromatina difusa, não condensada (NSN – *nonsurrounded nucleolus*); B – Padrão de cromatina condensada ao redor do nucleolo (SN – *surrounded nucleolus*); C – Padrão de cromatina condensada ao redor do nucléolo e envelope nuclear (SNE - *surrounded nucleolus and envelope*), p. 38
- Figura 3. Número de folículos nas três avaliações ultrassonográficas (Dia 0, intermediário e pré-LOPU) por classes de tamanho de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h, com G12, G36 e G60, respectivamente), p. 43
- Figura 4. Expressão gênica dos CCOs de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h), p. 48

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Quadro 1. Avaliação morfológica de oócitos de ovelhas em graus, p. 28
- Quadro 2. Sequência dos primers (início e fim) utilizados para avaliar genes relacionados a competência oocitária e genes de referência, em ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h), e suas respectivas referências, p. 41
- Tabela 1. Valores referentes à coleta e avaliação morfológica de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) coletados por laparoscopia (LOPU) em ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h), p. 44
- Tabela 2. Teste do *Brilliant Cresyl Blue* (BCB) em ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h), p. 45
- Tabela 3. Padrão de condensação da cromatina da vesícula germinativa em oócitos de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\* ovariana, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h), p. 46
- Tabela 4. Diâmetro dos oócitos de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\* ovariana, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h), p. 47

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAX	<i>BCL2 associated protein X</i>
BCB	<i>Brilliant Cresyl Blue</i> (azul cresil brilhante)
BCB-	CCO negativo no teste do <i>Brilliant Cresyl Blue</i>
BCB+	CCO positivo no teste do <i>Brilliant Cresyl Blue</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
BMP15	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
CCO	Complexo <i>cumulus</i> -oócitos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ETCO <sub>2</sub>	<i>End tidal CO<sub>2</sub></i> – (dióxido de carbono exalado ao final da expiração completa)
FSH	Hormônio folículo estimulante
G12	Grupo com <i>coasting</i> de 12 horas – grupo controle
G36	Grupo com <i>coasting</i> de 36 horas
G60	Grupo com <i>coasting</i> de 60 horas
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDF9	<i>Growth differentiation factor 9</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H2AFZ	<i>H2A histone family, member Z</i>
HAS2	<i>Hyaluronan synthase 2</i>
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IM	Intramuscular

IV	Intravenosa
LH	Hormônio luteinizante
LOPU	<i>Laparoscopic Ovum Pick-Up</i> (coleta laparoscópica de oócitos)
MAP	Medroxiprogesterona
MATER	<i>Maternal antigen that embryos require</i>
MHz	Megahertz
MmHg	Milímetro de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamina e adenina
NSN	Cromatina difusa em toda a área nuclear
OPU	Ovum pick-up (coleta de oócitos)
P <sub>4</sub>	Progesterona
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PGF <sub>2</sub> $\alpha$	Postaglandina-F <sub>2</sub> $\alpha$
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
qPCR	PCR quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
SN	Cromatina condensada ao redor do nucléolo
SNE	Cromatina condensada localizada ao redor do nucléolo e do envelope nuclear
TCM-199	<i>Tissue culture medium 199</i> (meio de cultura de tecidos 199)
UI	Unidade internacional
ZAR1	<i>Zygote arrest 1</i>

## 1 INTRODUÇÃO

A recuperação de complexos cumulus-oócitos (CCOs) de qualidade é essencial para a produção *in vitro* de embriões (PIVE), assim como para a clonagem e transgênese. Para o sucesso destas biotécnicas, é necessário que haja ainda um elevado número de CCOs obtidos, sendo esses um dos principais empecilhos para a maior difusão da PIVE em pequenos ruminantes (revisado por SOUZA-FABJAN et al., 2021). A laparoscopia (*laparoscopic ovum pick-up*, LOPU) é a técnica de eleição para a obtenção de oócitos *in vivo* em pequenos ruminantes. Nestas espécies, a utilização de protocolos hormonais é necessária para que o número de CCOs coletados seja expressivo, além de permitir o aumento da sua competência ao desenvolvimento, dependendo da dose e do regime de aplicação adotado (GIBBONS et al., 2007; SIRARD et al., 2006). Um bom protocolo de superestimulação deve proporcionar folículos médios e grandes para a LOPU, que possam produzir um oócito de boa qualidade.

Com o objetivo de otimizar o protocolo de superestimulação ovariana em ovelhas, Bragança et al. (2018) aplicaram pela primeira vez o protocolo dia zero (sincronização da onda folicular) e avaliaram quatro protocolos distintos para superestimulação, variando apenas a dose e o regime de aplicação do hormônio folículo estimulante (FSH). Os autores demonstraram que o protocolo que proporcionou oócitos de maior qualidade foi o que utilizou 80 mg de FSH em múltiplas doses, modulando adequadamente a expressão gênica dos CCOs. Posteriormente, Bragança et al. (2021) relataram que, no protocolo dia zero, a utilização de P4 exógena durante o protocolo de superestimulação ovariana, em comparação ao seu análogo acetato de medroxiprogesterona (MAP), teve efeitos positivos na expressão gênica e na competência oocitária. Ressalta-se que os autores utilizaram, em ambos os estudos, o intervalo de 12 h da última aplicação de FSH à LOPU.

Além de variações nos protocolos de superestimulação, diferentes tempos até o momento da coleta de oócitos têm sido estudados na PIVE em ruminantes. Este intervalo de tempo entre a última aplicação do FSH e a coleta do CCO é definido como *coasting time* (BLONDIN et al., 2002) e, em bovinos, já vem sendo aprimorado por cerca de 25 anos. Em 1997, um grupo de pesquisadores observou que o intervalo entre a administração de FSH e o abate, e entre o abate e a recuperação dos oócitos melhorou o número de CCOs competentes (BLONDIN; GUILBAULT; SIRARD, 1997). Estudos anteriores relatavam que, em animais superestimulados, ocorria um encurtamento do período entre a luteólise e o próximo pico do hormônio luteinizante (LH) (CALLESEN; GREVE; HYTTEL, 1986; GOFF et al., 1986). Essa janela de LH reduzida poderia estar, então, afetando a capacidade do oócito de adquirir a sua competência ao desenvolvimento (BLONDIN; GUILBAULT; SIRARD, 1997).

Surgiu então a necessidade de inserir o *coasting time* nos protocolos de superestimulação, para permitir que o CCO complete a sua maturação e se torne mais competente. Abdullah et al. (2008) testaram, em caprinos, algo similar ao *coasting*, prolongando o período sem FSH e gonadotrofina coriônica humana (hCG) até a LOPU. Houve uma melhora significativa na qualidade dos oócitos, visto que houve uma maior taxa de maturação *in vitro* e melhorou capacidade de desenvolvimento em blastocisto, além de aumentar o número de oócitos recuperados e a taxa de recuperação. Apesar disso, a literatura ainda é incipiente com relação aos possíveis efeitos do *coasting time* na predição de competência do oócito em ovelhas.

Neste contexto, foi hipotetizado que o *coasting time* pode ser benéfico, melhorando a qualidade dos oócitos ovinos, assim como ocorre em bovinos (NIVET et al., 2012). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes tempos de *coasting* na quantidade e na qualidade de CCOs de ovelhas, mensurada por diferentes técnicas como a avaliação morfológica, teste de

BCB, avaliação de padrão de condensação da cromatina e tamanho folicular/oocitário, além da análise de expressão gênica.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ESPÉCIE OVINA E A RAÇA SANTA INÊS

A ovinocultura é uma prática econômica de grande importância, realizada em todos os continentes, principalmente na Ásia, África e Oceania. Esta atividade vem se expandindo devido ao grande poder de adaptação da espécie a diferentes condições ambientais. Produções extensivas são observadas principalmente em países da África e Ásia, devido ao objetivo principal de consumo interno dos produtos oriundos da ovinocultura. Já na Europa e América do Sul a produção é mais intensiva, com destaque na produção de leite – para fabricação de queijos finos –, e produção de lã e carne dos rebanhos mestiços para a exportação, respectivamente (VIANA, 2008).

O Brasil possui um rebanho efetivo de pequenos ruminantes de aproximadamente 29.650.000 cabeças, dos quais cerca de 19 milhões são da espécie ovina (IBGE, 2019). Além de produzir carne, lã e leite, a ovinocultura possui um papel importante na área da pesquisa, contribuindo inclusive na área da medicina humana. Sendo assim, existe a preocupação crescente em aperfeiçoar o estudo da eficiência reprodutiva e melhoramento genético desses animais (ZHU et al., 2018).

A raça Santa Inês é uma das principais raças criadas no Brasil, por sua adaptabilidade a diferentes condições ambientais, sua habilidade materna, boa prolificidade e rápida maturidade reprodutiva (ROCHA et al., 2004). A rusticidade da raça, desenvolvida na região Nordeste do Brasil, é atribuída ao cruzamento entre as raças Somalis, Bergamácia e Morada Nova, além de outros ovinos sem raça definida. A sua origem pode ser confirmada por algumas de suas características. O porte, as orelhas, os vestígios de lã e o formato da cabeça dão indícios do cruzamento com a raça Bergamácia. O fato de ser uma raça deslanada, em sua maioria, e as variações de pelagens correspondem à raça Morada Nova. Além disso, a presença de uma porcentagem de gordura em torno

da base da cauda evidencia a inclusão da raça Somalis (SANTOS, 2003; VERÍSSIMO et al., 2009).

## 2.2 O FOLÍCULO ANTRAL

A foliculogênese é um processo de crescimento e maturação do folículo em que ocorrem diversas alterações, tanto nele em si quanto no oócito que ele abriga. A sua fase final, denominada foliculogênese antral, é dependente de hormônios gonadotróficos e culmina na formação do folículo antral. Chamado também de folículo de Graaf ou de folículo pré-ovulatório, o folículo antral é formado próximo ao término do crescimento do oócito (CLARKE, 2018), e recebe esse nome por ter como característica principal a formação de uma cavidade nomeada antro, que contém fluido folicular. Cada componente desse tipo de folículo vai contribuir para a formação de um microambiente ideal para que a diferenciação do oócito seja bem-sucedida (HENNET; COMBELLES, 2012).

A fase de foliculogênese antral sofre influência direta dos hormônios gonadotróficos, podendo ser considerada uma fase hormônio-dependente. O FSH vai proporcionar e sustentar o crescimento dos folículos. Com a formação da cavidade antral, o folículo, que será selecionado como o folículo dominante, passa a ter seu processo de esteroidogênese ativo e produzir estradiol. O estradiol e a inibina irão suprimir a ação e liberação do FSH, fazendo com que o folículo passe a depender hormonalmente do LH (HENNET; COMBELLES, 2012). Ao cessar o suporte de FSH, os demais folículos entram em atresia e regridem, enquanto o folículo selecionado como dominante passa a sintetizar mais receptores de LH e continua sua diferenciação até que a concentração de estradiol seja suficiente para promover *feedback* positivo sobre o eixo reprodutivo, estimulando o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação (GONZALEZ-AÑOVER et al., 2007). Em ovinos, o folículo desenvolve receptores de LH nas células da granulosa ao atingir 4 mm de diâmetro, e o que realiza esse processo primeiro será selecionado para tornar-se ovulatório (DRIANCOURT, 2001). Os pulsos pré-ovulatórios de LH adquirem maior

intensidade quanto mais tempo se passa da última ovulação (por conta da luteólise e consequente diminuição dos níveis de P4), até que ocorra a ovulação (HENNET; COMBELLES, 2012).

O fluido folicular, contido na cavidade do folículo antral, é formado por componentes derivados da corrente sanguínea e por secreções de células somáticas foliculares (HENNET; COMBELLES, 2012), como gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Esse fluido banha o oócito durante o seu desenvolvimento e permite a comunicação entre os diversos tipos celulares dentro do folículo, além de possuir componentes importantes na diferenciação oocitária, como espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, hormônios e metabólitos (HENNET; COMBELLES 2012).

Na foliculogênese antral, as células da granulosa e da teca sofrem alterações importantes. A formação da cavidade antral acaba levando as células da granulosa a se separarem e se tornarem dois tipos celulares distintos que desempenham diferentes funções: as células das granulosas murais e as células do *cumulus*. As células murais são as formadoras da parede interna do folículo, revestindo-o internamente. Já as células do *cumulus* são um tipo celular especializado, que vão circundar o oócito e formar o CCO (CLARKE, 2018; HENNET; COMBELLES, 2012). Já as células da teca têm o papel de revestir o folículo antral externamente, definindo seu limite, e são separadas do folículo interno por uma lâmina especializada de matriz extracelular chamada lâmina basal (HENNET; COMBELLES, 2012).

Na fase de dominância folicular, além das alterações que ocorrem no folículo, alterações no oócito também podem ser observadas. Durante a dominância ocorre um processo no oócito chamado capacitação, em que o seu envelope nuclear se torna ondulado e o remanescente do nucléolo apresenta um crescente vacúolo. A capacitação oocitária é essencial para que o oócito se torne

competente para retomar e completar a meiose e, após a fertilização, consiga se desenvolver até o estágio de blastocisto (VAN DER HURK; ZHAO, 2005).

### 2.3 AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

Em mamíferos, a competência do oócito é adquirida ao longo do crescimento folicular entre o estímulo de FSH e a onda pré-ovulatória de LH, e aumenta com o tamanho do folículo, para que, no momento da ovulação, possua as condições necessárias para suportar o desenvolvimento embrionário quando houver a ativação do genoma (SOUZA-FABIAN et al., 2014). O oócito tem uma fase de crescimento prolongada, cuja maior parte ocorre na fase anterior à fase de foliculogênese antral e se finaliza logo após a formação do antro, seguida de uma fase de capacitação e posterior período de maturação (HENNET; COMBELLES, 2012). Sendo assim, esta ocorre ao longo do crescimento folicular a fim de que o oócito crescido possa se autorregular via fatores de secreção parácrina, que contribuem para a plena competência (HUSSEIN et al., 2006).

No processo de diferenciação do oócito, para que ele possa prosseguir para um possível embrião em desenvolvimento, o citoplasma oocitário sofre alterações em suas organelas, que se acumulam e passam a se distribuir e organizar de uma nova maneira (HENNET; COMBELLES, 2012; HYTTEL et al., 1997). Em seu núcleo, o oócito se torna transcricionalmente ativo a partir da formação do folículo antral, havendo análises de RNA ribossomal em oócitos que demonstram que ainda não há atividade transcricional quando em folículos primordiais (HYTTEL et al., 2001). Há a criação de um estoque de mRNAs, que serão mobilizados em momentos específicos (CROCOMO; LANDIM-ALVARENGA; BICUDO, 2014), e que serão essenciais para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião até que o genoma embrionário seja ativado (HENNET; COMBELLES, 2012). Apesar de extremamente importante na aquisição da competência oocitária, a transcrição não possui longa duração no folículo antral. No penúltimo crescimento do oócito o *imprinting* de genes aumenta (O'DOHERTY; O'SHEA; FAIR, 2012), e no

crescimento final há uma repressão da transcrição e o nucléolo se torna inativo (FAIR et al., 1997).

Após concluir seu crescimento, o oócito precisa passar pela capacitação, ou pré-maturação, cujos eventos específicos ainda não são muito bem definidos. Esse processo inclui alterações moleculares e estruturais, como armazenamento adicional de proteínas e aumento de gotículas lipídicas e realocação de grânulos corticais (HYTTEL et al., 1997; DIELEMAN et al., 2002). A capacitação ocorre dentro do folículo antral e é indispensável para que o oócito adquira competência ao desenvolvimento (HENNET; COMBELLES, 2012).

Segundo Sirard et al. (2006), existem basicamente cinco níveis de competência oocitária, que representam a chave para caracterizar o desenvolvimento da competência. São descritas como capacidades: de retomar a meiose, de clivar após a fertilização, de se desenvolver até o estágio de blastocisto, de induzir prenhez, e levá-la a termo de maneira saudável. O sinal da inibição da meiose enviado pelas células somáticas do folículo é quebrado pela onda pré-ovulatória de LH, permitindo a progressão da meiose do núcleo oocitário, iniciando o processo de maturação (SIRARD et al., 1989). Quando os oócitos de mamíferos são retirados do folículo (por ovulação espontânea ou *ovum pick-up* - OPU, por exemplo), eles têm a capacidade de retomar a meiose espontaneamente (EDWARDS, 1965; SIRARD et al., 2006), não havendo necessidade de agentes estimulantes. Isso se dá pelo decréscimo das concentrações de AMPc dentro do oócito, causando falta de sincronia entre maturação nuclear, citoplasmática e molecular.

#### 2.4 GENES ENVOLVIDOS NA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA

Com a retomada da meiose, a atividade transcricional é interrompida até que haja a ativação do genoma embrionário e ele consiga, por si só, produzir suas próprias proteínas. Então, a partir da retirada do oócito do folículo, todos os seus processos até a ativação do genoma do embrião, passando pelo processo de

maturação, expansão do *cumulus*, fertilização e embriogênese inicial, são controlados pelos transcritos maternos que foram armazenados inativos no ooplasma (CROCOMO; LANDIM-ALVARENGA; BICUDO, 2014). Os genes de efeito materno, que estão envolvidos na regulação da clivagem inicial (DEAN, 2002), são necessários para o desenvolvimento do embrião pré-implantacional (WU et al., 2003). Eles são essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial, mas não são essenciais para nenhuma outra função vital (CONDIC, 2016).

*Maternal antigen that embryos require (MATER)* e *Zygote arrest 1 (ZAR1)* são genes de efeito materno reconhecidos, requeridos para o desenvolvimento apropriado do embrião durante seus estágios iniciais no período pós-fertilização (Wu et al., 2003). Tong, Nelson e Dean (2000) e Wu et al. (2003) mostraram que ratos mutantes que não expressam *MATER* e *ZAR1* (respectivamente nos estudos) são incapazes de produzir embriões que progridam além do estágio de uma a duas células, indicando que esses genes possuem função essencial no período antes da ativação do genoma embrionário. *ZAR1* é essencial durante a transição do oócito para o embrião e atua também na regulação da transcrição (BEBBERE et al., 2008). *MATER* possui um padrão de expressão similar ao de *ZAR1*, em que há uma marcada redução dos níveis de transcritos durante a maturação oocitária e no estágio entre oito e 16 células no embrião (BEBBERE et al., 2008).

Os genes *Growth differentiation factor 9 (GDF9)* e *Bone morphogenetic protein* e (*BMP15*) controlam eventos tanto na fase inicial quanto na final do desenvolvimento folicular e possuem diferentes vias de sinalização, sendo SMAD2/3 a via do *GDF9*, e SMAD1/5/8 a do *BMP15* (BELLI; SHIMASAKI, 2018). O efeito desses genes na competência ao desenvolvimento oocitário pode estar relacionado à melhor maturação nuclear e citoplasmática e à prevenção do endurecimento da zona pelúcida, entre outros (DEY et al., 2012). Eles possuem um importante papel no desenvolvimento folicular e competência oocitária, visto que estão envolvidos na proliferação das células do *cumulus* e na produção de

hormônios esteroides (ZHENG et al., 2008). *In vitro*, a suplementação do meio de maturação com esses fatores gerou uma melhoria na taxa de blastocistos (HUSSEIN et al., 2006).

Durante a maturação, *GDF9* e *BMP15* agem nas células do *cumulus* aumentando a expressão de mRNAs de fatores de expansão destas células, como, por exemplo, *hyaluronan synthase 2 (HAS2)*. Seu papel na expansão das células do *cumulus* é relacionado à produção do hialuronano, sendo, então, considerada fundamental e intimamente ligada à qualidade oocitária. É um importante pré-requisito para a extrusão do oócito do folículo na ovulação e, posteriormente, para a interação oócito-espermatozoide mediada pelo hialuronano. A *HAS2* foi mais expressa em oócitos BCB+ (oócitos positivos no teste do *Brilliant Cresyl Blue*) do que em BCB- (oócitos negativos no teste do *Brilliant Cresyl Blue*), dando indícios ainda mais fortes de sua participação na competência ao desenvolvimento do oócito (BHARDWAJ et al., 2016). *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2)* - conhecida também como cicloxigenase, que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H<sub>2</sub>) (MURAKAMI; KUDO, 2004; NUTTINCK et al., 2011) - também desempenha um papel importante durante a ovulação. Estudos demonstraram que sua inibição causa retenção do oócito no ovário em primatas não humanos (DUFFY; STOUFFER, 2002), redução da ovulação (40-60%) em roedores (MIKUNI et al., 1998; REESE et al., 2001) e infertilidade em ratas devido a ovulação defeituosa (DINCHUK et al., 1995), atribuída à formação anormal do *cumulus* (DAVIS et al., 1999; ANAMTHATHMAKULA; WINUTHAYANON, 2021). Sendo assim, a expressão de mRNA de *PTGS2* e *HAS2* em CCOs é relacionada à competência ao desenvolvimento oocitária e à predição de qualidade/morfologia embrionária (AMIRI; DELDAR; PIRSARAEI, 2016; MASIDE et al., 2021).

## 2.5 COASTING TIME

Uma nova ferramenta que vem sendo utilizada para modular a qualidade oocitária em bovinos é o *coasting time*, que corresponde ao intervalo da última aplicação de FSH do protocolo hormonal e a coleta de oócitos (NIVET et al., 2012). A aquisição máxima da competência oocitária ocorre entre o surgimento do FSH e a elevação do LH pré-ovulatório. Logo, a alteração deste tempo de *coasting* pode ser a chave para a obtenção de oócitos de melhor qualidade (SIRARD et al., 2006).

Estudos indicam que a implementação do *coasting time* em bovinos resultou na recuperação de CCOs imaturos com maior capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto após os procedimentos de fertilização *in vitro*. Além disso, apesar dos grupos não terem sido comparados no mesmo estudo, as taxas de desenvolvimento embrionário do grupo de oócitos imaturos recuperados após *coasting* superaram ou se igualaram às taxas de oócitos maturados *in vivo* e posteriormente submetidos aos demais processos *in vitro* (BLONDIN, 2002; SIRARD et al., 2006). Caso seja executado por um período correto para a espécie, o *coasting* proporcionará um microambiente folicular adequado para que o oócito adquira competência ao desenvolvimento (BLONDIN, GUILBAULT, SIRARD, 1997). Caso o *coasting* seja muito curto, os folículos podem permanecer com a sua maturação citoplasmática e/ou nuclear incompletas; se muito prolongado, causa atresia dos folículos e danos ao oócito (BLONDIN et al., 2002). Porém, é relatado que em fêmeas bovinas pré-púberes os oócitos atingem a atresia mais precocemente, indicando que um período curto de *coasting* nesses animais proporciona um melhor resultado embrionário (LANDRY et al., 2018).

Um estudo em bovinos, em que não foi realizada a sincronização hormonal e a aspiração folicular foi feita utilizando o diestro natural, demonstrou que o tempo de 44 a 68 h de *coasting* foi capaz de garantir elevada competência

oocitária, levando em consideração a taxa de blastocistos, sendo o ideal um *coasting* de  $54 \pm 7$  h (NIVET et al., 2012). O mesmo grupo de pesquisa relatou um ano depois ser necessário um período de estimulação com FSH e posteriormente um período de decréscimo dessas concentrações para que ocorresse a aquisição da competência; caso contrário, os folículos em crescimento ativo forneciam oócitos de baixa qualidade (NIVET et al., 2013). Além disso, alterações importantes no nível de transcriptoma são observadas em oócitos coletados *in vivo* em protocolos de *coasting* diferentes (LABRECQUE et al., 2013).

Estudos mais recentes em búfalos indicam que, nesta espécie, um menor tempo de *coasting* é mais benéfico do que tempos mais prolongados, diferente do que ocorre em bovinos. Foram testados em búfalas os *coastings* de 28-32 h, 40-44 h e 64-68 h e constatado que, para essa espécie, o menor tempo dentre os testados apresentou os melhores resultados por produzir maior porcentagem de blastocisto mais rápido e maior número médio de blastocistos grau I e II (PETROVAS et al., 2020).

Em caprinos, após estimulação com FSH e hCG, foram testados três tempos distintos de *coasting* (36, 60 e 72 h) em 15, 16 e sete cabras de raça mista, respectivamente. O grupo com 72 h de *coasting* resultou em maior taxa de recuperação), sendo esta de  $82,8 \pm 4,6\%$ . Além disso, os grupos com os maiores *coastings* (60 e 72 h) obtiveram  $69,0 \pm 8,4\%$  e  $82,1 \pm 2,8\%$ , respectivamente, de proporção de oócitos maturados *in vitro*, não diferindo entre si. Porém o grupo com 72 h de *coasting* obteve resultado melhor desse parâmetro em relação ao grupo de menor *coasting* (36 h -  $57,3 \pm 8,9\%$ ). Ao observarmos as taxas de clivagem de embriões de ICSI ( $70,9 \pm 8,4$  e  $78,9 \pm 8,2\%$ ) e a proporção de embriões de grau I ( $37,6 \pm 6,9$  e  $37,3 \pm 7,0\%$ ) - vemos que os maiores tempos de *coasting* (60 e 72 h, respectivamente) obtiveram as maiores taxas em relação ao grupo de 36 h de *coasting* ( $4,2 \pm 4,2\%$  de clivagem de embriões de ICSI e  $29,7 \pm 8,3\%$  de embriões grau A). Sendo assim, foi observado que um intervalo longo de 60-72 h do tratamento com FSH (e hCG) até a LOPU resultou, em caprinos, em um aumento

significativo no número de oócitos recuperados e na taxa de recuperação, melhorando não só a maturação *in vitro* desses oócitos, mas também melhorando a capacidade ao desenvolvimento em blastocisto (ABDULLAH et al., 2008).

Percebe-se, então, a necessidade de estudar o *coasting time* em diferentes espécies e avaliar seus tempos em cada uma delas, para que esta ferramenta se torne uma boa aliada na aquisição da competência ao desenvolvimento do oócito e na melhoria dos aspectos qualitativos e quantitativos envolvidos. Apesar do frequente uso do *coasting* em algumas espécies, a literatura ainda é incipiente com relação ao tempo de *coasting* em ovinos.

## 2.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO E PREDIÇÃO DA COMPETÊNCIA EM OÓCITOS IMATUROS

Avaliações morfológicas também são realizadas em oócitos a fim de escaloná-los em graus e predizer a sua qualidade. Homogeneidade citoplasmática, número de camadas de células do *cumulus* e grau de expansão de tais células são exemplos de critérios de seleção que podem ser observados a fim de sugerir qualidade oocitária. No quadro 1 é possível verificar os critérios utilizados para realizar a avaliação morfológica de oócitos de pequenos ruminantes em graus (SOUZA-FABJAN et al., 2013), podendo ser considerados também como “bons” (graus I e II), “aceitáveis” (grau III) e “pobres” (grau IV). Apesar de serem classificados apenas como aceitáveis, os CCOs grau III podem ser usados para produção de embriões (SOUZA-FABJAN et al., 2016). Entretanto, a classificação abaixo é considerada subjetiva e ineficiente em predizer a qualidade oocitária. Sendo assim, existem alternativas a fim de mensurar a competência oocitária por parâmetros objetivos e por marcadores que preservem a viabilidade oocitária.

Quadro 1. Avaliação morfológica de oócitos de ovelhas em graus (segundo SOUZA-FABJAN et al., 2016).

Classificação	Grau	Morfologia
“Bom”	I	Multicamadas compactas de células do <i>cumulus</i> com citoplasma uniformemente granulado
	II	1 a 3 camadas de células do <i>cumulus</i> com citoplasma uniformemente granulado
“Aceitável”	III	Revestimento celular incompleto ou citoplasma heterogêneo
“Pobre”	IV	Oócito com forma anormal e citoplasma heterogêneo

Uma estratégia para a triagem oocitária que indica que o oócito possui melhor capacidade de desenvolvimento é o teste do BCB, que é baseado na capacidade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) converter o corante de azul a incolor. A enzima G6PDH é envolvida na geração de ribose 5-fosfato e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) pela via das pentoses (ALM et al., 2005), e participa da síntese de nucleotídeos e formação de ácidos graxos. É sintetizada durante a oogênese e se encontra em plena atividade no oócito em crescimento. Assim, quando o oócito é submetido à coloração com BCB e não tem o seu desenvolvimento completo, o corante é consumido pela ação da enzima e retoma à coloração natural, sendo classificado como BCB-. Já os oócitos que apresentam o citoplasma com a coloração azulada/arroxeadada são classificados como BCBs+, uma vez que a atividade da G6PDH vai decrescendo à medida que a fase de crescimento do oócito se encerra e ele se torna mais susceptível a atingir a competência ao desenvolvimento (WANG et al., 2012).

Para cada espécie animal, a concentração ideal de BCB para a seleção de oócitos totalmente crescidos se altera. Com base em concentrações utilizadas em

outras espécies, o estudo de Wang et al. (2012) testou a concentração de 26  $\mu\text{M}$  comparada à de 52  $\mu\text{M}$  na espécie ovina. Apesar de não apresentarem diferença em relação à eficácia em corar os oócitos, a concentração considerada mais adequada foi a de 26  $\mu\text{M}$ , uma vez que os oócitos corados com essa concentração demonstraram uma maior taxa de maturação (86,2%) comparados ao grupo corado com 52  $\mu\text{M}$  (56,6%) e ao grupo controle – sem corante (77,8%). Essa mesma concentração já foi utilizada com sucesso anteriormente em nosso grupo, utilizando a mesma espécie e raça do presente estudo (BRAGANÇA et al., 2018; BRAGANÇA et al., 2021).

Um outro modo de avaliação da competência oocitária é a avaliação do grau de condensação da cromatina da vesícula germinativa. As modificações na condensação da cromatina durante o crescimento do oócito de mamíferos parecem coordenar o controle da transcrição global e definem o potencial de desenvolvimento de uma célula germinativa (RUSSO et al., 2007), e podem variar de acordo com cada espécie. Os oócitos ovinos que possuem cromatina não condensada ou difusa (NSN – *nonsurrounded nucleolus*) se encontram predominantemente em fase de crescimento, não conseguem ultrapassar o estágio de duas células, permanecem transcricionalmente ativos e sintetizam todas as classes de RNA; a cromatina no estágio NSN parece ter uma configuração imatura que os oócitos perdem quando eles ganham a plena capacidade de desenvolvimento. A cromatina condensada (SN – *surrounded nucleolus*) foi relacionada a crescimento e diferenciação, progressão da maturação meiótica, repressão global de atividade transcricional *in vivo* e capacidade de chegar a blastocisto (LODDE et al., 2007; RUSSO et al., 2007). Diferente do que já foi estudado em ratos, o padrão SN de configuração da cromatina não representa seu estágio mais avançado, já que folículos médios e pré-ovulatórios desenvolveram um novo padrão de configuração (SNE – *surrounded nucleolus and envelope*) onde a cromatina condensada se localiza parte ao redor do nucléolo e parte perto do envelope nuclear (RUSSO et al.,

2007). Visto que a remodelação da cromatina na vesícula germinativa está relacionada ao desenvolvimento do oócito, a avaliação desta se torna mais uma estratégia de predição de competência oocitária.

Há ainda correlação da qualidade oocitária com o tamanho dos folículos no momento da aspiração com o tamanho dos oócitos. Em bubalinos já foi relatado que o tamanho do folículo influencia na competência do oócito, visto que os oócitos recuperados de folículos grandes possuíram maior capacidade de se desenvolver a blastocisto (RAGHU; NANDI; REDDY, 2002). Em ovelhas, apesar de não haver alteração na taxa de recuperação de CCOs, foi constatado que a proporção de oócitos de boa qualidade aumenta com o tamanho do folículo, além de haver uma melhora na eficiência geral da técnica de coleta (RODRIGUEZ et al., 2006). Maside et al. (2021) relatam que oócitos ovinos de diâmetro intermediário e grande são mais desenvolvidos do que os de menor diâmetro, assim como o número total de embriões no estágio de 2-8 células e a taxa de blastocisto foram menores no grupo de oócitos pequenos em relação ao grupo com oócitos intermediários e grandes. É, portanto, sabido e amplamente aceito que a competência dos oócitos aumenta de acordo com o tamanho do folículo em diversas espécies domésticas (MERMILLOD et al., 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes tempos de *coasting* na quantidade e qualidade de CCOs em ovelhas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar, por ultrassonografia, a população folicular desde o início da estimulação hormonal com FSH até o momento da LOPU;
- Averiguar a qualidade morfológica dos oócitos obtidos a partir de cada tratamento;
- Determinar a proporção de oócitos BCB+ e BCB- em cada tratamento;
- Inferir a competência oocitária a partir do grau de condensação da cromatina da vesícula germinativa e do tamanho do oócito;
- Avaliar o perfil da expressão de genes relacionados à qualidade nos CCOs BCB+ de cada tratamento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ÉTICA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (#7226291020/2020) – em anexo.

### 4.2 LOCALIZAÇÃO

O experimento foi realizado na Unidade de Pesquisa Experimental em Caprinos e Ovinos (UNIPECO) da Fazenda Escola da Universidade Federal Fluminense, situada no município de Cachoeiras de Macacu, Estado do Rio de Janeiro (22°27' S 43°39' W).

### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

#### 4.3.1 *Animais*

Foram utilizadas 36 ovelhas adultas da raça Santa Inês, pluríparas e sem sinais aparentes de doenças (exame clínico, ginecológico e ultrassonográfico em D -14) durante a estação reprodutiva. As ovelhas foram alimentadas com capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) picado e 200 g de concentrado duas vezes por dia, assim como água e sal mineral *ad libitum*. Os animais foram mantidos em confinamento e sob controle sanitário, ambiental e nutricional previamente ao início até o final do estudo.

#### 4.3.2 *Protocolo de sincronização de estro*

Foi utilizado o “protocolo Dia 0” (Figura 1) para a sincronização da ovulação e da emergência da onda folicular conforme reportado por Bragança et al. (2018). No dia D-9 do protocolo (Figura 1) foi inserido o dispositivo intravaginal a base de P4 (Progespon®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários LTDA, Campinas, São Paulo), para iniciar a sincronização de estro dos animais. Em D-4 foi administrado 0,12 mg de PGF<sub>2α</sub> (Estron®, União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçu,

São Paulo) e 300 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários LTDA, Campinas, São Paulo), ambos por via intramuscular (IM). Em D-3 realizou-se a retirada do dispositivo intravaginal, detecção do estro (12 em 12 h) e a administração IM (36 h após retirada do dispositivo) de 0,025 mg de GnRH (Gestran<sup>®</sup>, União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçu, São Paulo).

#### 4.3.3 Protocolo de superestimulação ovariana

Em D0, 80 h após a retirada do primeiro dispositivo intravaginal, foi colocado o dispositivo intravaginal (Primer<sup>®</sup>, União Química Farmacêutica Nacional, Embu-Guaçu, São Paulo) impregnado com P4 exógena e iniciada a estimulação do crescimento folicular por meio da aplicação IM de 80 mg de FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, Ontario, Canadá) divididas em três doses decrescentes (50%, 30%, 20%) a cada 12 h. A coleta dos CCOs foi realizada seguindo o *coasting* de 12 (G12 - controle), 36 (G36) e 60 (G60) h. Foi utilizada a mesma estratégia de estimulação ovariana para todos os grupos, variando apenas o tempo de *coasting*, como mostra a Figura 1.

#### 4.4 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Para o acompanhamento do crescimento folicular foi utilizado ultrassom Sonoscape S6<sup>®</sup> (SonoScape, YizheBuilding, Yuquan Road, Shenzhen, China) acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz. As ultrassonografias foram realizadas conforme a técnica de Ginther e Kot (1994). As avaliações foram realizadas em D0 (início do protocolo de superestimulação), em um tempo intermediário para a avaliação da resposta ao tratamento (12 h para o grupo G12 e 24 h para os grupos G36 e G60), e imediatamente pré-LOPU para a contagem dos folículos. O diâmetro, a posição e as características das estruturas ovarianas foram anotados em fichas individuais e o diâmetro folicular foi obtido pela média das duas maiores distâncias (mm) entre dois pontos da cavidade antral dos folículos a partir de 2,0 mm.

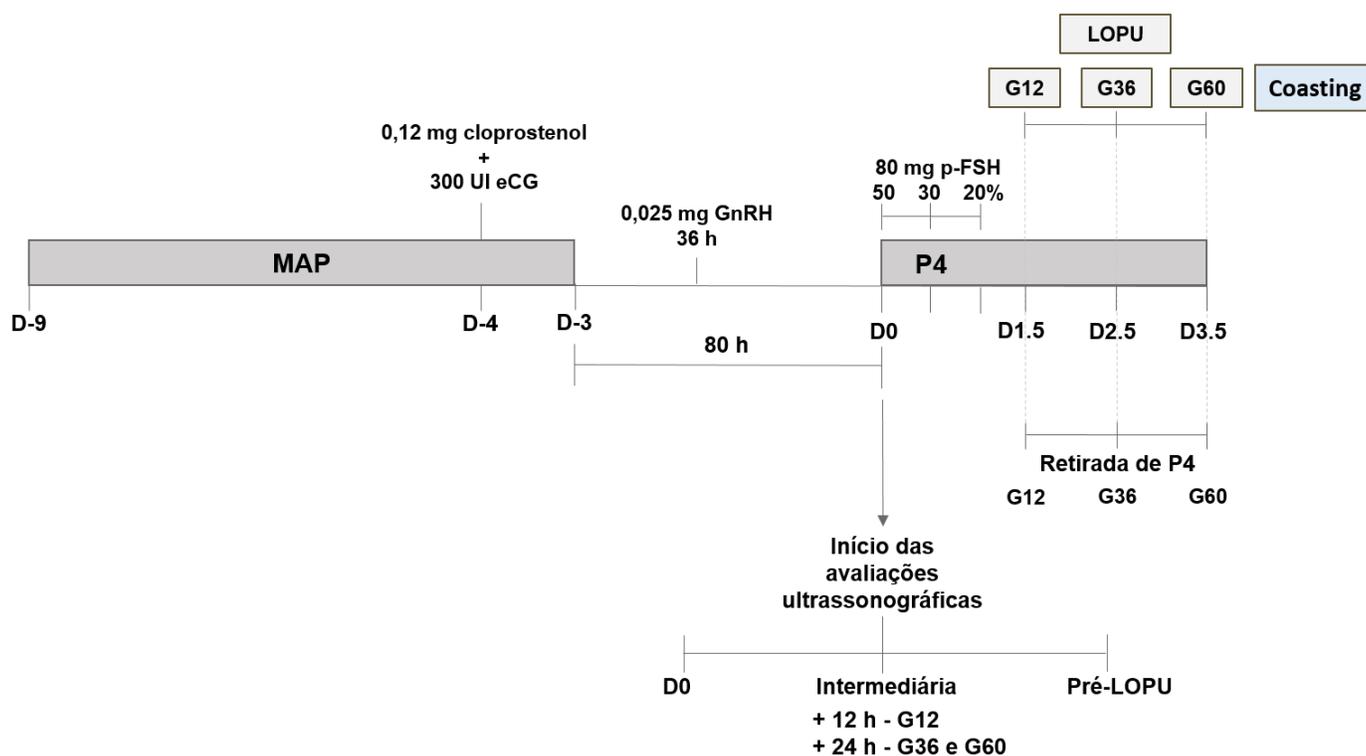


Figura 1. A figura ilustra a sincronização do estro e da emergência de onda folicular em ovelhas pelo “protocolo dia 0”, momento em que a estimulação ovariana é iniciada. O mesmo protocolo hormonal foi utilizado em cada grupo (G12, G36 e G60), variando apenas o *coasting time*.

#### 4.5 LAPAROSCOPIA E COLETA DOS CCOs

Foi realizada a redução de 50% da alimentação das ovelhas 48 h antes da laparoscopia. As ovelhas foram submetidas a jejum alimentar e hídrico 24 h e 12 h, respectivamente, antes da realização do procedimento cirúrgico. Cerca de 12 h antes da LOPU foi realizada tricotomia na região abdominal e nos membros anteriores, no local de canalização da veia para manutenção da via de acesso.

A medicação pré-anestésica foi realizada com: diazepam, na dose de 0,2 mg/kg (Diazepam, Teuto®, Goiás, Brasil) por via intravenosa (IV) associada a

acepromazina, dose de 0,1 mg/kg (Acepran<sup>®</sup>, Vetnil, São Paulo, Brasil) IV e morfina, dose de 0,4 mg/kg (Dolo Moff<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) IM. Para a indução anestésica foram utilizados cetamina na dose de 6 mg/kg IV, e propofol 1%, 10 a 20 mg IV (Profolen<sup>®</sup>, Balusiegel, São Paulo, Brasil); a via de acesso foi mantida com a administração de solução de Ringer Lactato (Ringer Lactato<sup>®</sup>, JP, São Paulo, Brasil). Em seguida, foi feita a intubação oro-traqueal para a manutenção anestésica com isoflurano (Forane<sup>®</sup>, Abbott Laboratórios, Rio de Janeiro, Brasil) por via inalatória e ventilação controlada e monitorizada. Os animais foram mantidos em ventilação controlada utilizando-se valores de frequência respiratória e volume corrente necessários para a manutenção de ETCO<sub>2</sub> entre 35 e 45 mmHg. A monitorização foi realizada com cardioscópio, monitor de pressão arterial não invasiva, oxímetro de pulso, termômetro digital, expirômetro, capnógrafo e analisador de gases expirados.

Os animais foram colocados em decúbito dorsal, em macas apropriadas, e foi feita a antissepsia da região tricotomizada com clorexidina degermante e clorexidina alcoólica; além de anestesia tópica com lidocaína 2% (0,2 mL/kg). Então, a maca foi posicionada com angulação aproximada de 45°, de modo que o animal ficasse com a cabeça mantida mais baixa que o corpo (posição de *Trendelemburg*).

Na região abdominal, foram realizadas três pequenas incisões sobre a pele nos locais de inserção dos trocartes. O primeiro trocarce foi inserido cranial ao úbere (aproximadamente a 6 cm) e à esquerda da linha média, através do qual foi introduzido o laparoscópio e pela válvula foi insuflada (*Pneumo Sure High Flow Insufflator, Stryker*) com CO<sub>2</sub> a cavidade abdominal, o que promoveu melhor visualização e manipulação do trato reprodutivo, além de guiar a inserção dos demais trocartes. O segundo trocarce foi introduzido em posição oposta ao primeiro, a direita da linha média, e foi destinado à passagem da pinça atraumática *BabCok*, utilizada para fixar os ovários. O terceiro trocarce foi inserido

na linha média, a cerca de 10 cm cranial ao úbere, e foi usado para a introdução do sistema de aspiração (WTA, Brasil).

Os folículos foram puncionados e aspirados através de um sistema composto de uma agulha 18 G com bisel curto, conectada a uma cânula de teflon de 50 cm de comprimento e a uma rolha de silicone, a qual foi acoplada a um tubo falcon de 50 mL, contendo 4 mL de TCM-199 (M2520; Sigma-Aldrich) suplementado com 20 UI/mL de heparina (Calbiochem 375095), 0,2 mM de piruvato (P4562 Sigma), 100 UI de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 0,25 mg/mL de anfotericina (A5955; Sigma) e 10% de BSA (*bovine serum albumin*; A9647; Sigma), conforme Bragança et al. (2018). O sistema foi conectado a uma bomba de vácuo (WTA, São Paulo, Brasil) com pressão de 30 a 40 mmHg. Após a aspiração, caso houvesse sangramento, cada ovário era cuidadosamente lavado com solução salina heparinizada (25 UI/mL) a 37 °C, para prevenir aderências, o abdômen foi desinflado e os trocartes removidos. Ao final, foi feita a oclusão dos orifícios dos trocartes com cola e curativo local com pomada cicatrizante e *spray* prata veterinário (unguento veterinário - óxido de zinco, óleo de pinho, caulim e xilol - e *spray* com fenitroton, cloridrato de clorexidina e alumínio).

Logo após a laparoscopia, os animais foram mantidos em ambiente tranquilo (bacias coletivas), sem estresse, com água e alimentação *ad libitum*, sob acompanhamento veterinário. Ao final destes procedimentos, os animais receberam anti-inflamatório não-esteroidal (Maxicam<sup>®</sup> 2%, Ourofino, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5 mg/kg via IM e antibiótico (Tetradur<sup>®</sup> LA-300, Merial, São Paulo, Brasil) na dose de 20 mg/kg via IM.

No laboratório, o líquido aspirado foi despejado cuidadosamente em placas de Petri e avaliado sob estereomicroscópio em aumento de 40X. Os CCOs foram recuperados com pipetas de 10 µL e colocados em meio de trabalho (solução tampão fosfato salino (PBS) suplementado com 1% de BSA) onde foi feita a triagem e seleção destes.

#### 4.6 SELEÇÃO DOS OÓCITOS COMPETENTES POR MEIO DO TESTE DO BCB

Os CCOs foram avaliados pela morfologia e classificados em graus I e II (boa qualidade, multicamadas compactas ou 1 a 3 camadas e citoplasma uniformemente granulado), III (aceitáveis, com revestimento celular incompleto ou citoplasma heterogêneo) e IV (pobres, disformes e com citoplasma heterogêneo, em morte celular). Após a classificação individual por graus, os CCOs de grau I, II e III (“bons” e “aceitáveis” - viáveis) de cada ovelha foram colocados em gota de 100 µL de meio de trabalho para que fosse feita uma lavagem desses CCOs. Posteriormente, foram expostos a 26 µM de BCB (Sigma, B-5388) diluído em PBS contendo 10% de BSA, e incubados por 60 min a 37,5 °C na estufa (*Forma Series 3 Water Jacket CO<sub>2</sub> Incubator – Model 4100 Series*). Decorrido o tempo, os oócitos foram novamente lavados em gota de 100 µL de meio de trabalho, cuidando para que todo o excesso de corante fosse realmente lavado, transferidos para uma nova gota de mesmo meio de volume, e classificados em: BCB+ (CCOs com citoplasma corado, considerado com crescimento finalizado) e BCB- (CCOs com citoplasma não corado, considerado em crescimento).

Após a classificação do BCB, os CCOs BCBs+ de cada fêmea foram congelados de modo que formassem *pools* de cinco CCOs, sendo dois de um indivíduo e um de cada indivíduo seguinte, até fechar a quantidade ideal para o *pool* (*pools* de cinco CCOs, totalizando 15 CCOs por tratamento). Os CCOs de cada *pool* foram colocados em criotubos (DNAse e RNAse free), com o menor volume de líquido possível (2 µL no máximo) e submetidos ao congelamento rápido em N<sub>2</sub> líquido e mantidos em botijões até a análise da expressão gênica.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DOS GRAUS DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA DA VESÍCULA GERMINATIVA

Em seguida ao teste do BCB, os CCOs BCBs+ excedentes (que não foram congelados a seco) e os BCBs- de cada indivíduo foram colocados em tubos Falcon de 15 mL (cada grupo de BCB em um tubo diferente) contendo 2 mL de

solução de trabalho (PBS e BSA a 1%) e, em seguida, colocados no vórtex durante 2 min para separar os oócitos das células do *cumulus* (SOUZA-FABJAN et al., 2013). Após o desnudamento, os oócitos foram recuperados em placa de Petri, fixados em paraformaldeído a 1% e refrigerados até a leitura. Os oócitos foram corados no escuro com Hoechst 33342 (LODDE et al., 2007), colocados individualmente em lâminas com lamínulas e analisados sob microscópio, e classificados em NSN, SN ou SNE, de acordo com o grau de condensação da cromatina da vesícula germinativa (Figura 2). Os oócitos NSN foram considerados aqueles com cromatina difusa em toda a área nuclear, já os SN com a cromatina condensada ao redor do nucléolo e os SNE com cromatina condensada localizada ao redor do nucléolo e do envelope nuclear (RUSSO et al., 2007).

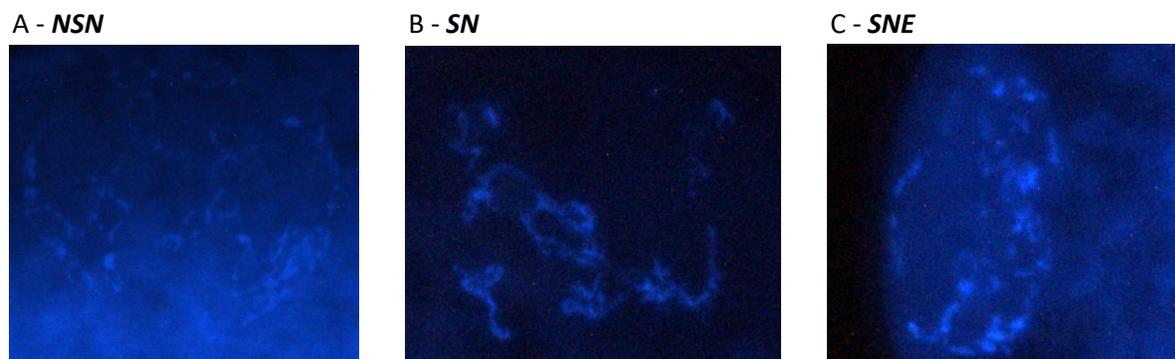


Figura 2. Padrões de condensação da cromatina da vesícula germinativa em ovinos. A – Padrão de cromatina difusa, não condensada (NSN – *nonsurrounded nucleolus*); B – Padrão de cromatina condensada ao redor do nucleolo (SN – *surrounded nucleolus*); C – Padrão de cromatina condensada ao redor do nucléolo e envelope nuclear (SNE - *surrounded nucleolus and envelope*).

#### 4.8 MEDIÇÃO DO DIÂMETRO DOS OÓCITOS

Após a avaliação do padrão de condensação da cromatina da vesícula germinativa, cada oócito foi colocado em uma lâmina, coberto com lamínula e fotografado para mensuração de seu diâmetro. A mensuração do diâmetro dos

oócitos foi realizada através do software ImageJ<sup>®</sup>. Para uma maior precisão na medição, o diâmetro foi considerado com a média de duas medidas (vertical e horizontal).

#### 4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Foi realizada análise da expressão de genes relacionados à capacidade de desenvolvimento do oócito como *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15*, *PTGS2* e *HAS2* e de genes associados a apoptose expressos tanto em células do *cumulus* quanto no oócito, *BAX* e *BCL2*. A análise da expressão gênica foi realizada por meio da PCR quantitativa (qPCR) associada a transcrição reversa, conforme Batista et al. (2014). Assim, para cada tratamento, foi extraído o RNA total utilizando o RNeasy Micro Kit (Qiagen Inc., Valencia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, cada amostra (5 µL) foi acrescida de tampão de lise RLT (75 µL) e misturada com um volume final igual (80 µL) de etanol a 70%. A mistura foi transferida para uma coluna tipo spin RNeasyMinElute e centrifugada. Em seguida, foi adicionado 350 µL do tampão de lavagem RW1 e realizada nova centrifugação. Após descarte do conteúdo do tubo da coluna, foi acrescido 500 µL de RPE, passando por centrifugação e descarte do conteúdo do tubo. Posteriormente, foi adicionado 500 µL de etanol 80% à coluna, que foi levada à centrífuga e, após centrifugação, o tubo foi descartado, substituído por um novo e a coluna foi levada novamente à centrífuga. Após a centrifugação, o tubo foi removido e suprido por um novo tubo de coleta, cônico e com tampa. Foi acrescido 14 µL de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna e, após um minuto de hidratação da membrana, a coluna foi centrifugada em velocidade máxima. Foi realizada, então, a quantificação de RNA nas amostras.

A transcrição reversa se realizou pela adição ao RNA de: primer oligo-dT (20 µM; Promega, Madison, EUA), Improm II (1 µL; Promega, Madison, EUA), dNTPs (0,5 mM de cada; Promega, Madison, EUA), RNaseOUT (2 UI/µL; Invitrogen, Carlsbad, EUA) e água isenta de RNase para um volume final de

reação de 20 µL. A transcrição reversa foi realizada a 65 °C durante 5 min e depois a 80 °C durante 10 min. Os cDNA obtidos foram armazenados a -20 °C para posterior utilização como moldes nas reações de amplificação por PCR em tempo real. Os controles negativos ou brancos foram preparados nas mesmas condições, porém sem a inclusão de transcriptase reversa.

Os transcritos de genes associados à competência previamente caracterizados, bem como dois genes de referência (*GAPDH* e *H2AFZ*), foram submetidos à amplificação quantitativa por PCR em tempo real em amostras de cDNA de CCOs. As reações (20 µL de volume total por amostra) foram conduzidas em equipamento MastercyclerRealplex (EppendorfRealplex 4s, Hamburg, Alemanha) e foram constituídas por: 2x FastStart Universal SYBR Green PCR Master Mix (10 µL; Roche, Mannheim, Alemanha), primers senso e antisenso específicos (0,2 µM cada) e cDNA (1 µL). As condições térmicas foram: 50 °C durante 2 min, 95 °C por 15 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s, seguido de curva MELT. Dados de fluorescência foram adquiridos durante a etapa de extensão. A especificidade de cada reação foi determinada através de análise da curva de *melting* dos amplicons obtidos. O padrão de eficiência do primer foi de 1,91; 1,92; 1,94; 1,93; 1,91; 1,96; 1,91; 1,95; 1,93 e 1,98 para *MATER*, *ZAR1*, *BMP15*, *GDF9*, *HAS2*, *PTGS2*, *BAX*, *BCL2*, *GAPDH* e *H2AFZ*. Valores limite e limiar por ciclo (Ct) foram automaticamente determinados pelo Realplex 2.2 *software* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), utilizando os parâmetros padrão. A expressão de cada gene-alvo foi normalizada utilizando a média geométrica dos valores obtidos para os transcritos de *GAPDH* e *H2AFZ*. Os controles negativos, foram reações sem adição de ácido nucléico.

No quadro 2, estão indicados os genes avaliados e suas respectivas sequências de nucleotídeos para formação do primer correspondente.

Quadro 2. Sequência dos *primers* (início e fim) utilizados para avaliar genes relacionados a competência oocitária e genes de referência, em ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h), e suas respectivas referências.

Genes	Sequência do primer (5'-3')	Referência
<b>BAX**</b>	F*: CCT GGG ATC TTG AAA CTC TCC TT R*: CTG GC CAG GCT GAA ATC AAA A	BRAGANÇA et al., 2018
<b>BCL2**</b>	F: GCC GAG TGA GCA GGA AGA C R: GTT AGC CAG TGC TTG CTG AGA	BRAGANÇA et al., 2018
<b>BMP15**</b>	F: GGG TTC TAC GAC TCC GCT TC R: GGT TAC TTT CAG GCC CAT CAT	BRAGANÇA et al., 2018
<b>GAPDH**</b>	F: GGG AAA TCG TGC GTG ACA TTA AG R: TGT GTT GGC GTA AGG TCT TTG	BRAGANÇA et al., 2018
<b>GDF9**</b>	F: CAG ACG CCA CCT CTA CAA CA R: CAG GAA AGG GAA AAG AAA TGG	BRAGANÇA et al., 2018
<b>H2AFZ**</b>	F: GTC GTG GCA AGC AAG GAG R: GAT CTC GGC CGT TAG GTA CTC	BRAIR et al., 2020
<b>HAS2**</b>	F: CCT CAT CCA AAG CCT G R: ACA TTT CCG CAA ATA GTC TG	MASIDE et al., 2021
<b>MATER**</b>	F: CAG CCT CCA GGA GTT CTT TG R: GAC AGC CTA GGA GGG TTT CC	BRAGANÇA et al., 2018
<b>PTGS2**</b>	F: AGG AGG TCT TTG GTC TGG TG R: TCT GGA ACA ACT GCT CAT CG	MASIDE et al., 2021
<b>ZAR1**</b>	F: CAC TGC AAG GAC TGC AAT ATC R: CAG GTG ATA TCC TCC ACT C	BRAGANÇA et al., 2018

\*F: forward; R: reverse.

\*\**BAX*: *BCL2* associated protein X; *BCL2*: B-cell lymphoma protein 2; *BMP15*: bone morphogenetic protein 15; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GDF9*: growth differentiation fator 9; *H2AFZ*: H2A histone family, member Z; *HAS2*: hyaluronan synthase 2; *MATER*: maternal antigen that embryo requires; *PTGS2*: prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *ZAR1*: zygote arrest 1.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por modelos lineares generalizados usando o software SAS versão 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC). As variáveis contínuas foram avaliadas para a normalidade usando o PROC

UNIVARIATE. As variáveis dependentes com distribuição normal (paramétricas) foram analisadas usando o PROC GLM e para as análises de comparações múltiplas foi utilizado o teste de Tukey. Dados não-paramétricos com distribuição de POISSON ou GAMMA foram analisados com o PROC GLIMMIX e função de ligação LOG. O número de folículos no primeiro momento (D0) e no segundo momento (12, 24 e 24 h após D0 para os grupos G12, G36 e G60, respectivamente) foram avaliados como medidas repetidas. As variáveis binomiais foram expressas como porcentagem e analisadas usando o PROC GLIMMIX com função de ligação LOGIT. As variáveis foram expressas como médias  $\pm$  SEM e o valor de significância estatística foi estabelecido em 5%, ou  $P < 0,05$ . Na análise estatística da expressão gênica, a estabilidade dos genes *GAPDH* e *H2AFZ* foi calculada com o uso do BestKeeper – Excel. Para a realização da quantificação relativa foi utilizado o método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), fazendo uso do software REST 2008 (LIVAK; SCHIMITTGEN, 2001), e a expressão dos genes alvo foi normalizada usando a média geométrica dos valores dos genes de referência.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 POPULAÇÃO FOLICULAR

As avaliações ultrassonográficas permitiram acompanhar a dinâmica de crescimento folicular em momentos do protocolo de superestimulação. O número de folículos das diferentes classes de tamanho observados no Dia 0 e na avaliação intermediária (segunda avaliação) não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os grupos. Na avaliação ultrassonográfica realizada na véspera das coletas (pré-LOPU), foi observada a presença de maior ( $P<0,05$ ) número de folículos pequenos ( $\leq 3,0$  mm) nos grupos G12 e G36 quando comparados ao grupo G60, enquanto o número de folículos médios (de 3,1 a 5,0 mm) não diferiu entre os grupos. Já o grupo com o *coasting* de 60 h apresentou um maior ( $P<0,05$ ) número de folículos grandes ( $>5,0$  mm) em comparação aos demais tempos de *coasting*, como pode ser observado na Figura 3.

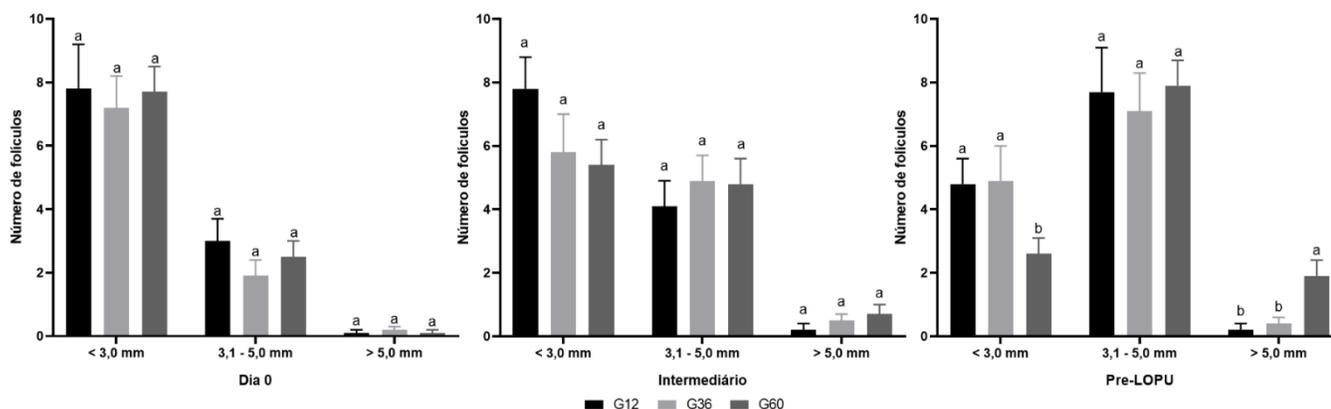


Figura 3. Número de folículos nas três avaliações ultrassonográficas (Dia 0, intermediário e pré-LOPU) por classes de tamanho de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h, com G12, G36 e G60, respectivamente). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  EPM. \*As ovelhas foram submetidas ao “Protocolo dia 0” para sincronização da ovulação e emergência da onda folicular, seguido de

superestimulação ovariana com três doses decrescentes de 80 mg de FSH (50%, 30% e 20%). Foram divididas em três grupos distintos, que foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização e superestimulação, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (tempo entre a última dose de FSH do protocolo hormonal de superestimulação ovariana e a coleta dos CCOs).

## 5.2 COLETA E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE CCOS

O número total de folículos aspirados foi de 377 folículos e o número total de CCOs foi de 189. Em relação aos dados referentes à LOPU e à avaliação morfológica dos CCOs, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados (tabela 1), sendo eles: número de folículos aspirados, taxa de recuperação, número total de CCOs, número total de CCOs bons (GI/GII), número total de CCOs viáveis (GI/GII/GIII), total de CCOs descartados (GIV), porcentagem de CCOs bons (GI/GII) e porcentagem de CCOs viáveis (GI/GII/GIII).

Tabela 1. Valores referentes à coleta e avaliação morfológica de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) coletados por laparoscopia (LOPU) em ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h).

Variáveis	G12**	G36**	G60**	Valor P
Número de folículos aspirados	12,0 ± 1,3	10,4 ± 1,0	10,0 ± 1,3	0,49
Taxa de recuperação (%)	53,8 ± 5,7	46,0 ± 3,9	51,3 ± 5,3	0,36
Nº total de CCOs***	6,4 ± 0,9	4,7 ± 0,5	5,3 ± 0,9	0,22
Nº de CCOs bons***	4,6 ± 0,5	2,9 ± 0,5	3,0 ± 0,9	0,06
Nº de CCOs viáveis***	6,2 ± 1,0	4,3 ± 0,5	4,8 ± 1,0	0,15
Total de CCOs descartados***	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,62
Porcentagem de CCOs bons (%)	72,9	62,5	57,1	0,31
Porcentagem de CCOs viáveis (%)	97,1	92,9	92,1	0,44

Os valores estão apresentados em média ± EPM.

\*As ovelhas foram submetidas ao “Protocolo dia 0” para sincronização da ovulação e emergência da onda folicular, seguido de superestimulação ovariana com três doses decrescentes de 80 mg de FSH (50%, 30% e 20%). Foram divididas em três grupos distintos, que foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização e superestimulação, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (tempo entre a última dose de FSH do protocolo de superestimulação e a coleta laparoscópica dos oócitos).

\*\*G12: 12 h de *coasting*; G36: 36 h de *coasting*; G60: 60 h de *coasting*.

\*\*\*Nº total de oócitos: GI/GII/GIII/GIV; bons: GI/GII; viáveis: GI/GII/GIII; descartados: GIV.

### 5.3 TESTE DO BCB

Quanto ao teste do BCB, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) em relação aos grupos (tabela 2), porém no tratamento G60 houve uma tendência ( $P < 0,10$ ) a maior porcentagem de BCB+. Um total de 178 CCOs foram submetidos ao teste do BCB. Destes, 145 foram classificados como BCB+ e 33 classificados como BCB-.

Tabela 2. Teste do *Brilliant Cresyl Blue* (BCB) em complexos *cumulus*-oócito de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h).

Variáveis	G12**	G36**	G60**	Valor P
Nº de CCOs submetidos ao BCB	6,2 ± 1,0	4,3 ± 0,5	4,8 ± 1,0	0,28
Nº de CCOs BCB +	5,1 ± 1,0	3,1 ± 0,4	4,3 ± 0,8	0,28
Nº de CCOs BCB -	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,18
Porcentagem de BCB+ (%)	82,4	71,2	89,7	0,07

Os valores estão apresentados em média ± EPM.

\*As ovelhas foram submetidas ao “Protocolo dia 0” para sincronização da ovulação e emergência da onda folicular, seguido de superestimulação ovariana com três doses decrescentes de 80 mg de FSH (50%, 30% e 20%). Foram divididas em três grupos distintos, que foram submetidas ao

mesmo protocolo de sincronização e superestimulação, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (tempo entre a última dose de FSH do protocolo de superestimulação e a coleta laparoscópica dos oócitos).

\*\*G12: 12 h de *coasting*; G36: 36 h de *coasting*; G60: 60 h de *coasting*.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA DA VESÍCULA GERMINATIVA

Na avaliação do padrão de condensação da cromatina da vesícula germinativa houve diferença entre os grupos (tabela 3). A cromatina com padrão SN, ou seja, condensada ao redor do nucléolo, se apresentou de maneira similar ( $P > 0,05$ ) entre os grupos. A frequência do padrão NSN (cromatina descondensada) foi menor ( $P < 0,05$ ) no grupo G60, comparado aos demais. Já o padrão de cromatina SNE (cromatina condensada perto do nucléolo e ao redor do envelope nuclear) foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo com o maior tempo de *coasting*, porém não diferiu entre G12 e G36. No total, 101 oócitos foram avaliados quanto ao padrão de condensação de suas cromatinas. Destes, 72 oócitos eram BCBs+ e 29 BCBs-.

Tabela 3. Padrão de condensação da cromatina da vesícula germinativa em oócitos de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\* ovariana, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h).

Variáveis	G12**	G36**	G60**	Valor P
NSN***	95,0% ± 3,4 <sup>a</sup>	80,7% ± 7,0 <sup>a</sup>	43,3% ± 9,0 <sup>b</sup>	<0,01
SN***	2,5% ± 2,4	6,5% ± 4,4	6,6% ± 4,6	0,68
SNE***	2,5% ± 2,4 <sup>c</sup>	12,9% ± 6,0 <sup>bc</sup>	50,0% ± 9,1 <sup>a</sup>	<0,01

Os valores estão apresentados em média ± EPM.

\*As ovelhas foram submetidas ao “Protocolo dia 0” para sincronização da ovulação e emergência da onda folicular, seguido de superestimulação ovariana com três doses decrescentes de 80 mg de

FSH (50%, 30% e 20%). Foram divididas em três grupos distintos, que foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização e superestimulação, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (tempo entre a última dose de FSH do protocolo de superestimulação e a coleta laparoscópica dos oócitos).

\*\*G12: 12 h de *coasting*; G36: 36 h de *coasting*; G60: 60 h de *coasting*.

\*\*\*NSN: padrão de cromatina descondensada; SN: padrão de cromatina condensada perto do nucléolo; SNE: padrão de cromatina condensada perto do nucléolo e ao redor do envelope nuclear.

## 5.5 MENSURAÇÃO DO DIÂMETRO DO OÓCITO

Dos 101 oócitos avaliados, os do grupo de maior tempo de *coasting*, G60, tiveram um maior diâmetro quando comparados ao grupo G12 ( $P < 0,05$ ), como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Diâmetro dos oócitos de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\* ovariana, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h).

Diâmetro	G12**	G36**	G60**	Geral	Valor P
Oócitos ( $\mu\text{m}$ )	114,6 <sup>b</sup> $\pm$ 2,8	118,5 <sup>a,b</sup> $\pm$ 3,0	123,1 <sup>a</sup> $\pm$ 2,6	118,3 $\pm$ 0,9	<0,01
Oócitos BCB+ ( $\mu\text{m}$ )	115,1 <sup>b</sup> $\pm$ 1,6	118,7 <sup>a,b</sup> $\pm$ 1,5	123,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1,3	118,9 $\pm$ 1,0	<0,01

Os valores estão apresentados em média  $\pm$  EPM.

\*As ovelhas foram submetidas ao "Protocolo dia 0" para sincronização da ovulação e emergência da onda folicular, seguido de superestimulação ovariana com 3 doses decrescentes de 80 mg de FSH (50%, 30% e 20%). Foram divididas em três grupos distintos, que foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização e superestimulação, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (tempo entre a última dose de FSH do protocolo de superestimulação e a coleta laparoscópica dos oócitos).

\*\*G12: 12 h de *coasting*; G36: 36 h de *coasting*; G60: 60 h de *coasting*.

## 5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão dos genes indicadores de qualidade oocitária está indicada na Figura 4. Ao analisar G12 vs G36, os genes *GDF9*, *BMP15*, *MATER* e *ZAR1* apresentaram níveis aumentados ( $P < 0,05$ ) em G36, enquanto os genes *BCL2*, *BAX* e *PTGS2* não diferiram entre os grupos citados. O gene *HAS2* se apresentou sub regulado em G36 em relação à G12 ( $P > 0,05$ ). Já na comparação entre G12 vs G60, os genes *BMP15*, *MATER*, *ZAR1*, *PTGS2* e *BCL2* estavam supra regulados em G60, enquanto os demais genes avaliados não diferiram. Quando foi analisado G36 vs G60, os genes *GDF9*, *BMP15*, *MATER*, *ZAR1* e *BAX* apresentaram níveis de expressão similares, enquanto *PTGS2*, *HAS2* e *BCL2* foram supra regulados em G60. A relação *BAX-BCL2* foi menor que um em todos os grupos.

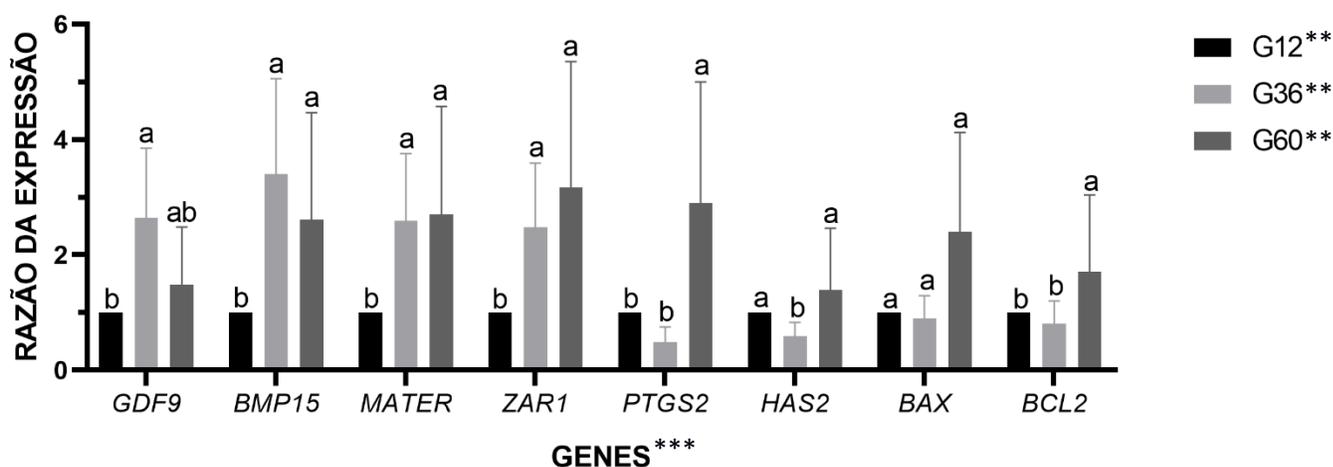


Figura 4. Expressão gênica dos CCOs de ovelhas submetidas a protocolo de superestimulação\*, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h). Os valores estão apresentados em média  $\pm$  EPM. \*As ovelhas foram submetidas ao “Protocolo dia 0” para sincronização da ovulação e emergência da onda folicular, seguido de superestimulação ovariana com três doses decrescentes de 80 mg de

FSH (50%, 30% e 20%). Foram divididas em três grupos distintos, que foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização e superestimulação, diferindo apenas nos tempos de *coasting* (tempo entre a última dose de FSH do protocolo de superestimulação e a coleta laparoscópica dos oócitos). \*\*G12: 12 h de *coasting*. Como a análise da expressão gênica é uma quantificação relativa e o grupo G12 é o grupo controle, todos os genes desse grupo foram considerados como 1. Os demais genes dos outros grupos foram quantificados em relação ao grupo controle, estando sub ou supra regulados, ou não variando; G36: 36 h de *coasting*; G60: 60 h de *coasting*. \*\*\* *GDF9*: *growth differentiation factor 9*; *BMP15*: *bone morphogenetic protein 15*; *MATER*: *maternal antigen that embryo requires*; *ZAR1*: *zygote arrest 1*; *PTGS2*: *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*; *HAS2*: *hyaluronan synthase 2*; *BAX*: *BCL2 associated protein X*; *BCL2*: *B-cell lymphoma protein 2*.

## 6 DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito que diferentes tempos de *coasting* (12, 36 e 60 h) teria na qualidade de CCOs em ovelhas. Hipotetizamos que, assim como os resultados de estudos em bovinos confirmam (NIVET et al., 2012), variações no tempo de *coasting* poderiam ser benéficas na melhoria da competência ao desenvolvimento dos oócitos de ovinos. A partir dos dados obtidos nesse estudo, pudemos destacar quatro pontos principais. O primeiro que, a partir dos dados referentes à LOPU e avaliação morfológica, os parâmetros avaliados, como número de folículos aspirados, taxa de recuperação, número total de oócitos, número de oócitos bons (graus I/II), viáveis (graus I/II/III) e descartados (grau IV), porcentagem de oócitos bons e viáveis apresentam pouca variação apesar dos diferentes tempos de *coasting*. O segundo, em relação ao funcionamento da G6PDH, verificada pelo teste do BCB, que o número de oócitos BCB+, de BCB- e a porcentagem de oócitos BCB+ também não diferem entre os distintos *coastings*, porém há uma tendência do *coasting* prolongado (60 h) apresentar uma maior porcentagem de oócitos BCB+. O terceiro, dialogando com o resultado do BCB, que o padrão SNE de condensação da cromatina se mostrou mais presente no grupo com 60 h de *coasting* do que nos demais grupos, indicando que um *coasting* mais prolongado é benéfico ao oócito, propiciando um desenvolvimento de competência maior em relação aos demais tempos de *coasting*. E o quarto, e final, que os resultados da expressão gênica indicam que os tempos mais avançados de *coasting* (36 e 60 h) em ovinos permitem que o oócito acumule mais transcritos e, conseqüentemente, tenha uma melhor capacidade de desenvolvimento. Tais pontos destacados, a partir dos resultados desse estudo, demonstram que um *coasting* prolongado em ovelhas, de aproximadamente 60 h, proporciona oócitos de melhor qualidade, sugerindo maior capacidade de desenvolvimento a blastocisto.

A resposta superestimulatória, taxa de recuperação média, número total CCOs, número de CCOs de boa qualidade e número de CCOs viáveis não diferiu

entre os grupos, e se apresentaram em valores similares aos obtidos em Bragança et al. (2018), que trabalharam com o mesmo protocolo de superestimulação do grupo controle e raça. No presente estudo, a taxa de recuperação e a porcentagem de oócitos bons (GI/GII) foram similares a estudos anteriores, em outras raças ovinas (GIBBONS et al., 2007; MENCHACA et al., 2018). A partir de tais dados, é possível afirmar que o protocolo de superestimulação utilizado em nosso estudo foi capaz de gerar uma resposta ovariana eficiente, permitindo a coleta de CCOs com boa qualidade morfológica e, segundo o teste do BCB, a maioria se apresentou totalmente crescida e, por isso, com maior capacidade de desenvolvimento.

A partir da análise da população folicular em cada classe de diâmetro, podemos inferir que o protocolo dia 0 permitiu uma primeira onda de desenvolvimento folicular padronizada para todos os grupos. Entre D0 e a avaliação pré-LOPU de contagem dos folículos, houve o crescimento esperado dos folículos, característicos da onda folicular, em que estes evoluíram de um tamanho pequeno, passando pela classificação de folículo de tamanho médio, até chegar ao folículo de tamanho grande. Tal progressão do tamanho dos folículos ao longo do protocolo de superestimulação, vista por meio das análises ultrassonográficas, indica que o protocolo foi bem conduzido e eficaz em estimular grande número de oócitos a partir de uma onda de emergência sincronizada (BALARO et al., 2016). Os resultados mostram que em 60 h de *coasting* havia mais folículos de tamanho grande em relação aos demais grupos, o que resulta em oócitos de maior dimensão e, possivelmente, com maior competência ao desenvolvimento (SOUZA-FABIAN et al., 2014; ROMAGUERA et al., 2011). Isto porque oócitos obtidos em tempos curtos de *coasting* provavelmente ainda estão sob influência do FSH e podem não ter completado seu processo de aquisição de competência (NIVET et al., 2012).

A ausência de qualquer diferença entre os tratamentos em relação ao número total de folículos está de acordo com achados prévios em bovinos e

(NIVET et al., 2012; PETROVAS et al., 2020). Isso mostra que o *coasting time* aparentemente não exerce influência no número de folículos disponíveis para aspiração e, portanto, na quantidade de CCOs. Por outro lado, no presente estudo, um tempo maior de *coasting* (60 h) resultou em mais folículos grandes comparado aos tempos menores de *coasting*, similar ao que já foi observado em bovinos (NIVET et al., 2012), mas em contraste com o que foi relatado recentemente em búfalos (PETROVAS et al., 2020).

O aumento do tamanho do folículo em G60 resultou em CCOs de maior tamanho em relação aos demais grupos. É sabido que oócitos que possuem áreas maiores possuem também uma maior capacidade de armazenar transcritos maternos que serão utilizados em sua fase zigótica inicial (SIRARD et al., 2006). Sendo assim, podemos concluir que os oócitos com 60 h de *coasting*, por terem um diâmetro maior e virem de folículos grandes, provavelmente possuem uma maior capacidade de desenvolvimento do que os oócitos oriundos de coletas com um tempo de *coasting* menor. Além disso, G60 teve tendência a apresentar maior porcentagem de oócitos BCB+, ou seja, com baixa atividade de G6PDH e, portanto, com crescimento completo (WANG et al., 2012) e obteve também maior padrão de condensação da cromatina (SNE), considerado o padrão mais avançado até a ovulação (RUSSO et al., 2007). Tais resultados confirmam que um maior tempo de *coasting* é benéfico ao crescimento e ao desenvolvimento de competência do oócito.

Interessante ressaltar que não foi possível detectar resultados conclusivos apenas com a avaliação morfológica dos CCOs que, como já se sabe, não é um bom critério para a avaliação da qualidade, uma vez que oócitos considerados de classe I, que não apresentariam sinais de degeneração, estariam na verdade em um estágio inicial de desenvolvimento (DIECI et al., 2016). Porém, análises complementares como o teste do BCB, a avaliação do padrão de condensação da cromatina da vesícula germinativa e a expressão de genes específicos de

competência oocitária nos fornecem mais informações sobre a qualidade desse oócito e sobre sua competência ao desenvolvimento.

Os fatores *GDF9* e *BMP15* possuem papéis fundamentais na regulação do desenvolvimento folicular e na maturação do oócito (MASIDE et al., 2021). Tais fatores, secretados pelo oócito, não devem ser considerados como independentes, mas sim como uma unidade funcional importante de sinalização em ruminantes. Isto porque *GDF9* sozinho pode não estimular a proliferação celular, mas provavelmente vai potencializar os efeitos mitogênicos da *BMP15* nas células da granulosa (MCNATTY et al., 2005). No presente estudo, *GDF9* foi menos expresso em G12 comparado a G36, porém não a G60. Ou seja, sua expressão aumentou do primeiro para o segundo grupo, e no grupo de maior *coasting* (G60), se apresentou de maneira a não diferir dos *coastings* anteriores. O aumento de seus níveis de mRNA, em humanos, é correlacionado com a maturação do oócito, com a competência oocitária e com a qualidade do embrião (LI et al., 2014). Já Maside et al. (2021) aponta que, apesar de os níveis de *GDF9* e *BMP15* aumentarem junto com a aquisição da qualidade oocitária em humanos e cabras, em oócitos suínos, caninos e, de acordo com o próprio estudo, ovinos, a expressão de mRNAs de *GDF9* foi mais baixa em oócitos que tinham uma maior capacidade de desenvolvimento embrionário. Essa diferença, apontam os autores, pode ser devida ao diferente estágio de maturação dos oócitos e/ou por conta de diferenças entre espécies. No presente estudo, apesar de não significativo, *GDF9* se apresentou sub regulado em comparação à G36, indo de acordo com Maside et al. (2021). Já *BMP15*, independente de agir em sinergia ou não com *GDF9*, é responsável pela proliferação das células da granulosa e sua resposta ao FSH, modulando a maturação e o crescimento folicular (ESTIENNE et al., 2017). Tal gene se comportou de maneira diferente de *GDF9*, sendo supra regulado tanto em G60 quanto em G36, em relação à G12, porém não diferindo entre si. Sendo assim, conforme o tempo de *coasting* aumentou, a expressão desse gene

aumentou também, porém a partir de 36 h já atingiu o pico de sua expressão, estando também supra regulado, mas não diferindo de 60 h.

Os genes *MATER* e *ZAR1* são conhecidos por possuir uma marcante diminuição dos seus padrões de expressão a partir da ativação do genoma embrionário, com *MATER* sendo indetectável no estágio de 16 células (BEBBERE et al., 2008). Eles possuem padrões de expressão similares e se fazem necessários em um período de desenvolvimento anterior à ativação do genoma zigótico. Quando os transcritos de mRNA de *MATER* e *ZAR1* são bastante expressos, como nos grupos G36 e G60 em relação ao G12, servem para predizer o desenvolvimento de competência oocitária (BRAGANÇA et al., 2018).

A expressão de *PTGS2* em CCOs é relacionada com a capacidade de desenvolvimento do oócito e do embrião (ANAMTHATHMAKULA; WINUTHAYANON, 2021), e os altos níveis de mRNA em G60 de *PTGS2* deste estudo, assim como de *HAS2*, podem ser correlacionados com aquisição de competência oocitária, como já foi associado em diversas espécies, como a bovina (ASSIDI et al., 2008), suína (KANG et al., 2011) e humana (MCKENZIE et al., 2004). Nesse estudo, *PTGS2* foi mais expresso em G60 em relação aos demais grupos, enquanto *HAS2* teve maior expressão em G60 quando comparado à G36, porém não diferiu em relação à G12. *HAS2*, que está envolvido na maturação final do oócito (SCHOENFELDER; EINSPANIER, 2003), teve sua expressão melhorada em humanos (MCKENZIE et al., 2004) e ovelhas (AMIRI; DELDAR; PIRSARAEI, 2016), e tal fato foi associado a uma melhor qualidade tanto do desenvolvimento do oócito quanto embrionário. Também foi bastante expresso em oócitos classificados como grandes e que produzem blastocistos, ou seja, de boa qualidade (MASIDE et al., 2021).

Como já é sabido, *BCL2* atua como gene anti-apoptótico, ou seja, promove a sobrevivência da célula. Enquanto isso, *BAX* é um fator associado à *BCL2* que atua promovendo a apoptose, ou seja, a morte celular (AMIRI, DELDAR;

PIRSARAEI, 2016; ZHANG; SAGHATELIAN, 2013). Tais fatores participam da via apoptótica dependente da mitocôndria (MASIDE et al., 2021) e necessitam estar expressos na célula em uma situação de equilíbrio, de proporção igual entre si, a fim de que *BCL2* interaja com *BAX* e neutralize a sua atividade. Caso isso não ocorra e a proporção de *BAX* seja maior que a de *BCL2* há a liberação de citocromo C no citoplasma e, conseqüentemente, as caspases são ativadas, o que indica que a célula está iniciando o processo de morte celular. Por isso, a expressão desses genes deve ser entendida como uma relação de um para o outro, e essa relação pode ser usada para predição de competência do oócito (BRAIR et al., 2020). Os resultados desse estudo mostram que os genes *BAX* e *BCL2* mantêm a proporção entre si (menor que um) em todos os grupos, apesar de *BCL2* estar supra regulado em G60, não havendo indícios de apoptose celular em nenhum dos grupos.

O fato do grupo G60 ter folículos de tamanhos maiores, oócitos de maior tamanho, tendência de possuir mais oócitos BCB+, apresentarem a vesícula germinativa com padrão SNE e ter um padrão alto de expressão dos genes *GDF9*, *BMP15*, *MATER*, *ZAR1*, *PTGS2* e *HAS2* em relação aos demais tempos testados, indica que o *coasting* interfere na qualidade dos oócitos e que, possivelmente, este grupo possui os oócitos mais competentes e aptos a chegarem a blastocistos de qualidade. O conhecimento de que o *coasting* afeta a qualidade dos oócitos ovinos, que refletirá na qualidade do embrião, nos permite aplicar essa ferramenta com a finalidade de melhorar as técnicas já existentes e implementadas e, com isso, atingir taxas cada vez mais expressivas e bem-sucedidas nas biotécnicas reprodutivas nesta espécie.

## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível identificar que o tempo de *coasting* afeta a competência ao desenvolvimento dos oócitos ovinos. O tempo de 60 h é mais adequado dentre os tempos de *coasting* avaliados nesse estudo a partir da superestimulação de ovelhas, visto que proporcionou a obtenção de oócitos provenientes de folículos maiores, com maior diâmetro e com estágio mais avançado de condensação da cromatina (SNE), além de modular melhor os genes relacionados à qualidade oocitária. Implementar o tempo correto de *coasting* ao protocolo de superestimulação de fêmeas ovinas pode impactar positivamente o cenário atual de produção *in vitro* de embriões desta espécie.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, R. B.; LIOW, S. L.; RAHMAN, A. N. M. A.; CHAN, W. K.; WAN-KHADIJAH, W. E.; NG, S. C. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. *Theriogenology*, v. 70, p. 765-771, 2008.

ALM, A.; TORNER, H.; LOHRKE, T.; GHONEIM, I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, v. 63, p. 2194–2205, 2005.

AMIRI, M. V.; DELDAR, H.; PIRSARAEI, Z. A. Impact of supplementary royal jelly on *in vitro* maturation of sheep oocytes: genes involved in apoptosis and embryonic development. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v. 62, p. 31-38, 2016.

ANAMTHATHMAKULA, P.; WINUTHAYANON, W. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) in the oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Endocrinology*, v. 162, p. 1-14, 2021.

ARMSTRONG, D. T., IRVINE, B. J., EARL, C. R., MCLEAN, D. SEAMARK, R. F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, v. 42, p. 1227-36, 1994.

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

BALARO, M. F. A.; BRANDÃO, F. Z.; PENEIRAS, A. B. V.; OBA, E.; FONSECA, J. F.; ALMOSNY, N. R. P.; CARDOSO, E. C. R. Productive performance, metabolic and hormonal profiles of Santa Inês ewes in winter and summer under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, v. 47, p. 627–631, 2015.

BALARO, M. F. A.; FONSECA, J. F.; BARBOSA, T. G. B.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; FIGUEIRA, L. M.; TEIXEIRA, T. A.; CARVALHEIRA, L. R.; BRANDÃO, F. Z. Potential role for GnRH in the synchronization of follicular emergence before the superovulatory Day 0 protocol. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 54, p. 10-14, 2016.

BALARO, M. F. A.; FONSECA, J. F.; OBAR, E.; CARDOSO, E. C.; BRANDÃO, F. Z. Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder. *Tropical Animal Health and Production*, v. 46, p. 1533–1537, 2014.

BALDASSARRE H, FURNUS CC, DE MATOS DG, PESSI H. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotrophin

treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, v. 45, p. 707-17, 1996.

BALDASSARRE, H. Practical aspects for implementing *in vitro* embryo production and cloning programs in sheep and goats. *Animal Reproduction*, v. 9, p. 188-94, 2012.

BALDASSARRE, H.; DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; CASTRO, T. E.; CABRERA FISCHER, E. I. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Animal Reproduction Science*, v. 35, p. 145-150, 1994.

BALDASSARRE, H.; PIERSON, J. T.; POULIN, S.; SNEEK, L.; ROGAN, D.; HOCKLEY, D. K. Preliminary report on the use of a slow-release formulation for administration of FSH in three assisted reproduction applications in goats. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, p. 255, 2011.

BALDASSARRE, H.; RAO, K. M.; NEVEU, N.; BROCHU, E.; BEGIN, I.; BEHBOODI, E.; HOCKLEY, D. K. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 612-616, 2007.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, v. 57, p. 275-284, 2002.

BARTLEWSKI, P. M.; BABY, T. E.; GIFFIN, J. L. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, v.124, p. 259-268, 2011.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; COOK, S. J.; RAWLINGS, N. C. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 113, p. 275-85, 1998.

BATISTA, R. I., RAPOSO, N. R., CAMPOS-JUNIOR, P. H., et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of *in vitro*-produced crossbred bovine embryos. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 10, p. 5-33, 2014.

BEBBERE, D.; BOBLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; LEONI, G. G.; TORE, S.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; NAITANA, S.; LEDDA, S. Expression pattern of zygote arrest 1 (ZAR1), maternal antigen that embryo requires (MATER), growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) genes in ovine oocytes and *in vitro*-produced preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, p. 908-915, 2008.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. W.; GINTHER, O. J. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 432–441, 2001.

BELLI, M.; SHIMASAKI, S. Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. *Vitamins and Hormones*, v. 107, 2018.

BERLINGUER, F.; GONZALEZ-BULNES, A.; SUCCU, S.; LEONI, G.; MOSSA, F.; BEBBERE, D.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J.A.F.; VEIGA-LOPEZ, A.; NAITANA, S. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 32, p. 303–314, 2007.

BERLINGUER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.P.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*, v. 61, p. 1477-1486, 2004.

BHARDWAJ, R.; ANSARI, M. M.; PANDEY, S.; PARMAR, M. S.; CHANDRA, V.; KUMAR, G. S.; SHARMA, G. T. GREM1, EGFR, and HAS2; the oocyte competence markers for improved buffalo embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, p. 1-8, 2016.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H., BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competence bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; GUIBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*, v. 48, p. 803-13, 1997.

BRAGANÇA, G. M.; BATISTA, R. I. T. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; ALFRADIQUE, V. A. P.; ARASHIRO, E. K. N.; PINTO, P. H. N.; SANTOS, J. D. R.; CAMARGO, L. S. A.; MENCHACA, A.; FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Exogenous progestogens differentially alter gene expression of immature cumulus-oocyte complexes in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 74, p. 106518, 2021.

BRAGANÇA, G. M.; BATISTA, R. I. T.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; ALFRADIQUE, V. A. P.; ARASHIRO, E. K. N.; COSENTINO, I. O.; PINTO, P. H. N.; CAMARGO, L. S. A.; DA FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Dose and administration protocol for FSH used for ovarian stimulation affect gene expression in sheep cumulus-oocyte complexes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, p. 1234-44, 2018.

BRAIR, V. L.; MAIA, A. L. R. S.; CORREIA, L. F. L.; BARBOSA, N. O.; SANTOS, J. D. R.; BRANDÃO, F. Z.; FONSECA, J. F.; BATISTA, R. I. T. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G. Gene expression patterns of *in vivo*-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique. *Cryobiology*, 2020.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, v. 25, p. 71-86, 1986.

CATALÁ, MG.; IZQUIERDO, D.; UZBEKOVA, S.; MARATÓ, R.; ROURA, M.; ROMANGUERA, R.; PAPILLIER, P.; PARAMIO, T. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, v. 142, p. 517–527, 2011.

CHEN, A. Q.; YU, S. D.; WANG, Z. G.; XU, Z. R.; YANG, Z. G. Stage-specific expression of bone morphogenetic protein type I and type II receptor genes: Effects of follicle-stimulating hormone on ovine antral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 111; p. 391–399, 2009.

CHESSA, B.; PEREIRRA, F.; ARNOUD, F.; AMORIM, A.; GOYACHE, F.; et al. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations B. *Science*, v. 324, p. 532–536, 2009.

CLARKE, H. J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *WIREs Developmental Biology*, v. 7, 2018.

CONDIC, M. L. The Role of Maternal-Effect Genes in Mammalian Development: Are Mammalian Embryos Really an Exception? *Stem Cell Reviews and Reports*, 2016.

CONSTANZO, L. S. Fisiologia. *Guanabara Koogan*, 1 ed., p. 392, 1999.

CROCOMO, L. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Controle molecular do acúmulo, tradução e degradação de mRNA. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 38, p. 141-146, 2014.

CUADRO, F.; SANTOS-NETO, P. C.; PINCZAKA, A.; BARRERA, N.; CRISPO, M.; MENCHACA, A. Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 196, p. 205-210, 2018.

DARBON, J-M.; KNECT, M.; RANTA, T.; DUFAU, M. L.; CATTG, K. Hormonal Regulation of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase in Cultured Ovarian Granulosa Cells. *The journal of biology chemistry*, v. 259, p. 14778-14782, 1984.

DAVIS, B. J.; LENNARD, D. E.; LEE, C. A.; et al. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology*, v. 140(6), p. 2685-2695, 1999.

DEAN, J. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, p. 171–180, 2002.

DEY, S. R.; DEB, G. K.; HA, A. N.; LEE, J. I.; BANG, J. I.; LEE, K. L.; et al. Coculturing denuded oocytes during the in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology*, v. 77, p. 1064-1077, 2012.

DIECI, C.; LODDE, V.; LABRECQUE, R.; DUFORT, I.; TESSARO, I.; SIRARD, M-A.; LUCIANO, A. M. Differences in cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine embryo production. *Molecular Human Reproduction*, 2016.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. 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.

DINCHUK, J. E.; CAR, B. D.; FOCHT, R. J.; et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, v. 378, p. 406-409, 1995.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUFFY, D. M.; STOUFFER, R. L. Follicular administration of a cyclooxygenase inhibitor can prevent oocyte release without alteration of normal luteal function in rhesus monkeys. *Human Reproduction*, v. 17(11), p. 2825-2831, 2002.

EDWARDS, R. G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, v. 208, p. 349–51, 1965.

ESTIENNE, A.; LAHOZ, B.; JARRIER, P.; BODIN, L.; FOLCH, J.; ALABART, J-L.; FABRE, S.; MONNIAUX, D. BMP15 regulates the inhibin/activin system independently of ovulation rate control in sheep. *Reproduction*, v. 153(4), p. 395–404, 2017.

EVANS, A. C. O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 289-306, 2003.

EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M. P. Waves of follicle development during the estrus cycle in sheep. *Theriogenology*, v. 53, p. 699-715, 2000.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, p. 208-215, 1997.

FIGUEIRA, L. M.; ALVES, N. G.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; VERGANI, G. B.; OLIVEIRA, M. E. F.; LIMA, R. R.; FONSECA, J. F. Ultrasonographic cervical evaluation: A tool to select ewes for non-surgical embryo recovery. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 55(11), p. 1638-1645, 2020.

FONSECA, J. F. da.; CRUZ, R. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA-FABJAN, J. M. G. de.; VIANA, J. H. M. Biotecnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos. Brasília, DF; Embrapa, 2014.

GIBBONS, A.; PEREYRA BONNET, F.; CUETO, M.; CATALA, M.; SALAMONE, D.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 423-426, 2007.

GINTHER, O. J.; BALDRIGHI, J. M.; SIDDIQUI, M. A. R.; ARAUJO, E. R. Complexities of follicle deviation during selection a dominant follicle in *Bos Taurus* heifers. *Theriogenology*, v. 86, p. 2012-19, 2016b.

GINTHER, O. J.; SIDDIQUI, M. A. R.; BALDRIGHI, J. M.; WOLF, C. A. Systemic effect of follicle-stimulating hormone and intraovarian effect of the corpus luteum on complete regression vs recovery of regressing wave-2 follicles in heifers. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 55, p. 51–59, 2016a.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, v. 42, p. 987-1001, 1994.

GIRARD, A.; DUFORT, I.; DOUVILLE, G.; SIRARD, M. A. Global gene expression in granulosa cells of growing, plateau and atretic dominant follicles in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, p. 13-17, 2015.

GOFF, AK.; GREVE, T.; BOUSQUET, D.; RING, WA. Progesterone and luteinizing hormone profiles in heifers used as oocyte donors. *Theriogenology*, v. 26, p. 577-586, 1986.

GÓMEZ-CHANG, E.; LARREA, F.; MARTÍNEZ-MONTES, F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, v. 15(1), p. 24-36, 2012.

GONZALEZ-AÑOVER, P.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; AMMOUN, I.; CONTRERAS, I.; ROS, J. M.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J. A. F.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 29-33, 2007.

GRANADOS L. B. C.; DIAS A. J. B.; SALES M. P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. Projeto PROEX/UENF, 1 ed., 2006.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. W. H. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Journal of Developmental Biology*, v. 56, p. 819-831, 2012.

HILLIER SG, WHITELAW PF, SMYTH CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin's model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 100, p. 51-54, 1994.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*, v. 296, p. 514-21, 2006.

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

HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*, v. 122, p. 21-30, 2001.

IBGE, agropecuária, efetivos da agropecuária, 2018. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 01 de novembro de 2021.

KANG, J. T.; ATIKUZZAMAN, M.; KWON, D. K.; PARK, S. J.; KIM, S. J.; MOON, J. H.; KOO, O. J.; JANG, G.; LEE, B. C. Developmental competence of porcine oocytes after In Vitro maturation and In Vitro culture under different oxygen concentrations. *Zygote*, v. 20, p. 1-8, 2011.

KHAN, D. R., GUILLEMETTE, C., SIRARD, M. A. RICHARD, F. J. Characterization of FSH signaling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence acquisition. *Molecular Human Reproduction*, v. 21, p. 688-701, 2015.

LABRECQUE, R.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Gene expression. Analysis of bovine oocytes with high developmental competence obtained from FSH-stimulated animals. *Molecular Reproduction & Development*, v. 80, p. 428-440, 2013.

LAHOZ, A.; ALABART, J. L.; FOLCH, J.; SÁNCHEZ, P. S.; ECHEGOVEN, E.; COCERO, M. J. Influence of the FecXR allele in heterozygous ewes on follicular population and outcomes of IVP and ET using LOPU-derived. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, p. 717-723, 2013.

LANDRY, D. A.; ROSSI-PERAZZA, L.; LAFONTAINE, S.; SIRARD, M. A. Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. *Reproduction and Fertility*, 2013.

LARIMORE, E. L.; AMUNDSON, O. L.; BRIDGES, G. A et al. Changes in ovarian function associated with circulating concentrations of estradiol before a GnRH-induced ovulation in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, p. 2-9, 2016.

LASTER, D. B. Disappearance and uptake of [<sup>125</sup>I] FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 30, p. 407-415, 1972.

LEAL, G. R.; MONTEIRO, C. A. S.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; VASCONCELOS, C. O. P.; NOGUEIRA, L. A. G.; FERREIRA, A. M. R.; SERAPIÃO, R. V. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte in vitro maturation in domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 2018.

LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 14, p. 141-153, 2013.

LI, Y.; LI, R. Q.; OU, S. B.; ZHANG, N. F.; REN, L.; WEI, L. N.; ZHANG, Q. X.; YANG, D. Z. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, p. 81, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F.; LUCIANO, A. M. Large-scale chromatin remodelling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 740-9, 2007.

LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J. M.; WILTBANK, M. C. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 84, p. 369-78, 2011.

LUO, W.; WILTBANK, M. C. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 217-25, 2006.

MADELLA-OLIVEIRA, A. F.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A. Principais hormônios que controlam o comportamento reprodutivo e social das fêmeas ruminantes – Revisão. *PUBVET*, v. 8, ed. 252, art. 1668, 2014.

MASIDE, C.; SÁNCHEZ-AJOFRÍN, I.; MEDINA-CHÁVEZ, D.; ALVES, B.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Oocyte morphometric assessment and gene expression profiling of oocytes and cumulus cells as biomarkers of oocyte competence in sheep. *Animals*, 11, 2818, 2021.

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

MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*, v. 129, p. 481-487, 2005.

MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction & Development*, v. 51, p. 36-41, 1998.

MENCHACA, A.; CUADRO, F.; DOS SANTOS-NETO, P.C.; BOSOLASCO, D.; BARRERA, N.; BRUN, V.; CRISPO, M. Oocyte developmental competence is improved by relatively greater circulating progesterone concentrations during preovulatory follicular growth. *Animal Reproduction Science*, v. 195, p. 321-328, 2018.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, p. 113–18, 2010.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, 2007.

MENCHACA, A.; VILARINO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAN, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v. 72, p. 477–483, 2009.

MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; TRAVERSO, J.-M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MONGET, P. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43 (Suppl. 2), p. 393-400, 2008.

MIKUNI, M.; PALL, M.; PETERSON, C. M.; et al. The selective prostaglandin endoperoxide synthase-2 inhibitor, NS-398, reduces prostaglandin production and ovulation in vivo and in vitro in the rat. *Biology of Reproduction*, v. 59(5), p. 1077-1083, 1998.

MILLER, W.J.; BOSE, H.S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *Journal of Lipid Research*, v. 52, p. 2116-2135, 2011.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Progress in Lipid Research*, v. 43, p. 3–35, 2004.

NIVET, A. L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*, v. 143, p. 165–171, 2012.

NIVET, A. L.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Changes in granulosa cells' gene expression associated with increased oocyte competence in bovine. *Reproduction*, v. 145, p. 555–565, 2013.

NUTTINCK, F.; GALL, L.; RUFFINI, S.; LAFFONT, L.; CLEMENT, L.; REINAUD, P.; ADENOT, P.; GRIMARD, B.; CHARPIGNY, G.; GUIENNE, B. M-L. PTGS2-Related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. *Biology of Reproduction*, v. 84, p. 1248-1257; 2011.

O'DOHERTY, A. M.; O'SHEA, L. C.; FAIR, T. Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins. *Biology of Reproduction*, v. 86, 2012.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, v. 86, p.152-159, 2016.

PEDROSA, S.; UZUN, M.; ARRANZ, J. J.; GUTIÉRREZ-GIL, B.; PRIMITIVO, F. S.; BAYÓN, Y. Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 272, p. 2211–2217, 2005.

PETROVAS, G.; KOSIOR, M. A.; PRESICCE, G. A.; RUSSO, M.; ZULLO, G.; ALBERO, G.; ALKAN, S.; GASPARRINI, B. FSH Stimulation with Short Withdrawal Improves Oocyte Competence in Italian Mediterranean Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animals*, 2020.

PIERSON, J., WANG, B., NEVEU, N., SNEEK, L., CÔTÉ, F., KARATZAS, N. C., BALDASSARRE, H. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick up in goats. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, p. 795-9, 2004.

RAGHU, H.M.; NANDI, S.; REDDY, S.M. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, v. 14, p. 55–61, 2002.

REESE, J.; ZHAO, X; MA, W. G.; BROWN, N.; MAZIASZ, T. J.; DEY, S. K. Comparative analysis of pharmacologic and/or genetic disruption of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 function in female reproduction in mice. *Endocrinology*, v. 142(7), p. 3198-3206, 2001.

ROCHA, R. A., AMARANTE, A. F. T., BRICARELLO, P. A. Influence of reproduction status on susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism. *Small Ruminant Research*, v. 55 (1–3), p. 65–75, 2004.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; CHAMORRO, C. A.; PAZ, P. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 106-113, 2006.

ROMAGUERA, R.; MOLL, X.; MORATO, R.; ROURA, M.; PALOMO, M. J.; CATALA, M. G.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; HAMMAMI, S.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats. *Theriogenology*, v. 76, p. 1-11, 2011.

RUSSO, V.; MARTELLI, A.; BERARDINELLI, P.; DI GIACINTO, O.; BERNABO, N.; FANTASIA, D.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Modifications in chromatin morphology and organization during sheep oogenesis. *Microscopy Research and Technique*, v. 70, p. 733-744, 2007.

SANTOS, R. A cabra e a ovelha no Brasil. *Agropecuária Tropical*, p. 479, 2003.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1403-1409, 2001.

SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 69; p. 269-277, 2003.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 40, p. 1257-63, 1989.

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

SNYDER, D. A.; DUKELOW, W. R. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnosis and follicle aspiration in sheep. *Theriogenology*, v. 2, p. 143-148, 1974.

SOUSA, F. C.; MELO, C. H. S.; TELES FILHO, A. C. A.; AVELAR, S. R. G.; MOURA, A. A. A.; MARTINS, J. A. M.; FREITAS, V. J. F.; TEIXEIRA, D. I. A. Ovarian follicular response to different hormonal stimulation treatments in Canindé goats. *Animal Reproduction Science*, v. 125, p. 88-93, 2011.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; BATISTA, R. I. T. P.; CORREIA, L. F. L.; PARAMIO, M. T.; FONSECA, J. F.; FREITAS, V. J. F.; MERMILLOD, P. In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 33, p. 31-54, 2021.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N.; LOCATELLI, Y.; VICENTE, J. F. F. MERMILLOD, P. In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*, v. 81, p. 1149–1162, 2014.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; PEREIRA, A. F.; MELO, C. H. S.; SANCHEZ, D. J. D.; OBA, E.; MERMILLOD, P.; MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, V. J. F. Assessment of the reproductive parameters, laparoscopic oocyte recovery and the first embryos produced in vitro from endangered Canindé goats (*Capra hircus*). *Reproductive Biology*, v. 13, p. 325-332, 2013.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; LOCATELLI, Y.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; BATISTA, R. I. T. B.; FREITAS, V. J. F.; BECKERS, J-F.; MERMILLOD, P. Intrinsic quality of goats oocytes already found denuded at collection for in vitro embryo production. *Theriogenology*, v. 86, p. 1989-1998, 2016.

STANGL, M.; KTIHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, v. 52, p. 709-716, 1999.

SUMMERS, A. F.; POHLMEIER, W. E.; SARGENT, K. M.; COLE, B. D., et al. Altered Theca and Cumulus Oocyte Complex Gene Expression, Follicular Arrest and Reduced Fertility in Cows with Dominant Follicle Follicular Fluid Androgen Excess. *Plos One*, v. 9, Issue 10, e110683, 2014.

SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 101, p. 547-55, 1994.

TEIXEIRA, P. P. M.; PADILHA, L. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; MOTHEO, T. F.; SILVA, A. S. L.; BARROS, F. F. P. C.; COUTINHO, L. N.; FLORES, F. N.; LOPES, M. C. S.; et al. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte. *Animal Reproduction Science*, v. 127, p. 169-175, 2011.

TERVIT, H. R. Laparoscopy/laparotomy oocytes recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 227-238, 1996.

THAMMASIRI, J.; NAVANUCRAW, C.; URIYAPONGSON, S.; KHANTHUSAENG, V.; KAMOLLIRT, C. Expression of cumulus-oocyte complex genes and embryonic development in goats subjected to progestogen-based estrus synchronization. *Theriogenology*, v. 86, p. 612-18, 2016.

TONG, Z. B.; NELSON, L. M.; DEAN, J. Mater encodes a maternal protein in mice with a leucine-rich repeat domain homologous to porcine ribonuclease inhibitor. *Mammalian Genome*, v. 11, p. 281-287, 2000.

TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C.; HÖLKER, M.; TOMEK, W.; PHATSARA, C.; ALM, H.; SIRARD, M-A.; KANIT, W.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Focus on Mammalian Embryo genomics Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*, v. 135, p. 197–212, 2008.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VERÍSSIMO, C. J.; TITTO, C. G.; KATIKI, L. M.; BUENO, M. S.; CUNHA, E. A.; MOURÃO, G. B.; OTSUK, I. P.; PEREIRA, A. M. F.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; TITTO, E. A. L. Tolerância ao calor em ovelhas Santa Inês de pelagem clara e escura. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 10, p. 159-167, 2009.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*, v. 4, p. 1-9, 2008.

WANG, L.; LIN, J.; HUANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; CHEN, T. Selection of ovine oocytes by Brilliant Cresyl Blue staining. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.

WU, X.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J.; BAI, Y.; FITZPATRICK, S. L.; MATZUK, M. M. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature Genetics*, v. 33, p. 187-191, 2003.

ZHANG, T.; SAGHATELIAN, A. Emerging roles of lipids in BCL-2 family-regulated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013.

ZHENG, X.; PRINCE, C. A.; TREMBLAY, Y.; LUSSIER, J. G.; CARRIÈRE, P. D. Role of transforming growth factor- $\beta$ 1 in gene expression and activity of estradiol and progesterone-generating enzymes in FSH-stimulated bovine granulosa cell. *Reproduction*, v. 136, p. 447-457, 2008.

ZHU, J.; MOAWAD, A. R.; WANG, C. Y.; LI, H. F.; REN, J. Y.; DAI, Y. F. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 6, p. 15-26, 2018.

## 9 ANEXO



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na vitrificação de oócitos ovinos coletados por laparoscopia após diferentes tempos de coasting", protocolada sob o CEUA nº 7226291020 (ID 001014), sob a responsabilidade de **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan e equipe; Thais de Almeida Oliveira; Jasmine Bantim de Souza Pinheiro; Ana Lucia Rosa e Silva Maia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 10/12/2020.

We certify that the proposal "Effect of antifreeze protein (AFP I) type I on the vitrification of sheep oocytes collected by laparoscopy after different coasting times", utilizing 42 Ovinos (males and females), protocol number CEUA 7226291020 (ID 001014), under the responsibility of **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan and team; Thais de Almeida Oliveira; Jasmine Bantim de Souza Pinheiro; Ana Lucia Rosa e Silva Maia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 12/10/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2021 a 01/2023** Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 7 anos**

N: **42**

Linhagem: **Santa Inês**

Peso: **50 a 100 kg**

Local do experimento: O estudo será realizado em diferentes instalações da Universidade Federal Fluminense. A superestimulação ovariana, obtenção dos oócitos, avaliação morfológica, seleção por BCB serão realizadas na FECM - Fazenda Escola Cachoeiras de Macacu, em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro (RJ). A MIV, a vitrificação, as análises dos oócitos pós-aquecimento, teste de viabilidade e imunohistoquímica, além das avaliações moleculares serão realizadas na Faculdade de Veterinária da UFF, Niterói, Rio de Janeiro (RJ).

Niterói, 08 de março de 2021

Profª Carla Eponina  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Fluminense

Profª Caroline de Souza Barros  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Fluminense