

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

**EFEITOS DA INDUÇÃO SEQUENCIAL APÓS A PRÉ MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE
A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA**

NATHALIA ROMEIRO SILVA

BOTUCATU – SP

2023

NATHALIA ROMEIRO SILVA

**EFEITOS DA INDUÇÃO SEQUENCIAL APÓS A PRÉ MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE
A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador

Prof. Dr. José Buratini Júnior

Co-orientadora

MSc. Thaisy Tino Dellaqua

BOTUCATU – SP

2023

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

Silva, Nathalia Romeiro.

Efeitos da indução sequencial após a pré maturação *in vitro*
sobre a produção embrionária / Nathalia Romeiro Silva. -
Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Buratini Júnior

Coorientador: Thaisy Tino Dellaqua

Capes: 20701004

1. Bovinos. 2. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos.
3. Neuregulina-1. 4. Bovinos - Reprodução. 5. Embriologia
veterinária.

Palavras-chave: Cultivo sequencial; Maturação *in vitro*;
PIVE; Pré-MIV.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Adriana e Wagner, por me permitirem voar para longe de casa, me sustentarem e por me acolherem sempre que preciso. Aos meus irmãos Catarina e Davi por serem meu porto seguro, por compartilharem momentos comigo que só nós, os três melhores amigos, poderiam ter juntos. Aos meus avós Cláudio, Elisabete e Amara pelo carinho que só avós têm. A minha tia Tuti por sempre me apoiar. A minha família, por todo amor e por ser orgulharem de mim mesmo que nem sempre entendam o que eu faço.

Aos meus amigos da vida, que estão comigo nos momentos bons e quando estou reclamando, obrigada Lucas e Gabriel por alegrarem os meus dias.

Aos amigos que conheci em Botucatu e fizeram essa caminhada ser uma grande aventura. Obrigada Mariana e Pâmela por serem minha nova casa. Obrigada Leandro por ser uma extensão da minha nova casa. E obrigada a tantas pessoas que passaram pela minha vida durante esses cinco anos e que de alguma forma marcaram minha vida.

Obrigada ao meu orientador Dr. José Buratini por me permitir a oportunidade de conhecer o Laboratório de Fisiologia Molecular e Ovariana e deste lugar me fazer crescer tanto em conhecimento e abrir portas para o meu futuro. Obrigada às minhas companheiras e amigas de laboratório Ana Caroline, Carolina, Drielle, Mariana e Thaisy por todo aprendizado e rotina. Em especial obrigada Thaisy por me ensinar os procedimentos, por me alimentar tantas vezes e também por me coorientar.

Obrigada a Unesp por me proporcionar tantas experiências, por me formar uma biomédica e obrigada a Botucatu por me trazer tanta vivência e por me acolher longe de casa.

SUMÁRIO

RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO	10
3. HIPÓTESE.....	10
4. METODOLOGIA	10
4.1 Delineamento experimental.....	10
4.2 Obtenção dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos (COCs) <i>post mortem</i>	11
4.3 Pré-maturação oocitária <i>in vitro</i>	12
4.4 Maturação oocitária <i>in vitro</i>	12
4.5 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	12
4.6 Análise estatística	13
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSSÃO	16
7. CONCLUSÃO.....	17
8. REFERÊNCIAS.....	18

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões bovinos desempenha um papel importante na pecuária e na pesquisa, além de ser utilizada como embasamento para melhorias das técnicas de reprodução assistida. Esse estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver meios de cultivo com base nos processos que ocorrem *in vivo*. Com o objetivo de aprimorar um sistema de maturação oocitária já estabelecido em nosso laboratório, o Sistema Folicular (SF), utilizamos os indutores FSH e ampirregulina (AREG) de maneira sequencial, a fim de promover uma ativação mais fisiológica da cascata de maturação. Esse novo sistema foi denominado SF sequencial (SFseq). Ovários bovinos foram coletados em abatedouros e seus complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram aspirados e submetidos à pré-MIV durante 9 horas e, na sequência, passaram por diferentes protocolos de MIV: (1) MIV induzida apenas com FSH (grupo FSH), (2) MIV induzida com o SF (grupo SF) e (3) MIV com o SF sequencial (grupo SFseq). Os COCs alocados no grupo SFseq foram primeiramente submetidos a 6h de cultivo em meio idêntico ao SF, exceto pela exclusão de AREG, e posteriormente, cultivados por mais 16h em meio SF completo. Após a maturação, os COCs foram avaliados quanto a expansão do *cumulus* e posteriormente submetidos à fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). No terceiro dia do cultivo, a clivagem embrionária foi analisada e ao final de 7 dias de cultivo, a taxa de produção de blastocistos, seu grau de desenvolvimento e número de células foram avaliados. Os dados foram comparados por ANOVA ou Kruskal-Wallis e as diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Os tratamentos SF e o SFseq promoveram maior porcentagem de COCs completamente expandidos ao final da MIV em relação ao grupo FSH, mas não diferiram entre si. O SFseq resultou em taxas de desenvolvimento (total e de blastocistos expandidos e eclodidos) numericamente, mas não significativamente, superiores em relação aos grupos FSH e SF. O tratamento SFseq produziu embriões com maior número de células em relação ao tratamento SF, mas não diferiu estatisticamente do grupo FSH quanto a esse parâmetro. Os dados sugerem que a estratégia sequencial pode melhorar a eficácia do SF, embora isso deve ser confirmado durante a continuidade dos estudos com maior número de réplicas experimentais e o ajuste das concentrações de FSH e AREG nas etapas do tratamento sequencial.

Palavras-chave: maturação *in vitro*, cultivo sequencial, pré-MIV, PIVE

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (TRA) envolvem todas as intervenções *in vitro* relacionadas às manipulações de espermatozoides, oócitos e embriões (De Geyter, 2019). Dentre elas, a fertilização *in vitro* (FIV) é a mais conhecida, a qual é amplamente utilizada em clínicas de reprodução humana. Nestas clínicas, um protocolo completo de FIV envolve a estimulação dos ovários por meio de gonadotrofinas, agonistas e/ou antagonistas de GnRH, de modo a estimular o desenvolvimento folicular e impedir a ovulação antecipada (von Wolff, 2019), seguida de coleta dos oócitos, fecundação com espermatozoides selecionados e preparados previamente, cultivo embrionário e transferência do embrião para o útero ou criopreservação. Nessa técnica, a fecundação pode ocorrer naturalmente, quando ambos os gametas são cultivados em condições adequadas, sendo conhecida como FIV clássica, ou pode ser realizada por meio da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) diretamente no interior do oócito. Após essa etapa, os zigotos resultantes são cultivados em incubadoras e esse cultivo *in vitro* (CIV) é realizado normalmente por 5 ou 6 dias (D5 ou D6), até que o embrião alcance o estágio de blastocisto, no qual apresenta potencial para continuar seu desenvolvimento. Assim, o embrião é avaliado quanto a viabilidade e normalidade cromossômica (Neblett et al., 2021), e, em seguida, poderá ser transferido para o útero materno ou, em outros casos, ser congelado para uso futuro.

Outra TRA é a maturação *in vitro* (MIV), em que os oócitos são retirados do ovário para serem maturados em laboratório. Essa técnica tem sido analisada como uma nova possibilidade de tratamento para mulheres com síndrome do ovário policístico, com resistência ao estímulo de FSH, ou para preservar a fertilidade de mulheres que fazem tratamento de câncer (Gilchrist *et al.*, 2016; Lonergan and Fair, 2016; Buratini *et al.*, 2021b).

Na maturação *in vivo*, ocorrem eventos fisiológicos que precedem a fertilização e o desenvolvimento embrionário, como a maturação citoplasmática e a retomada meiótica do oócito (Mattioli et al, 2001). Nesse período, as organelas são redistribuídas no citoplasma e o núcleo, que estava bloqueado na fase prófase I (estágio conhecido como vesícula germinativa em protocolos animais) desde a vida fetal, progride até metáfase II por meio de sinalizações pré-ovulatórias, para então concluir a meiose após a fecundação (Lonergan and Fair, 2016).

A MIV envolve a coleta de complexos *cumulus*-oócito (COCs) em estados imaturos de vesícula germinativa (VG) provenientes de ovários minimamente ou não estimulados, para passarem pelo processo de maturação *in vitro* e posterior fecundação *in vitro*. Essa biotecnologia já tem sido utilizada em animais, sendo extensivamente aplicada na produção de

espécies da pecuária, como suínos (Herrick *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2012; Okamoto *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2022), equinos (Leemans *et al.*, 2016; Morris, 2018; Lodde *et al.*, 2019) e, principalmente, em bovinos (Loneragan and Fair, 2016; Barros *et al.*, 2019; Franchi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Pioltine *et al.*, 2021; Dellaqua *et al.*, 2023a; Janini *et al.*, 2023). Por isso, estudos têm sido realizados em busca de melhorias, tanto para o processo em si da maturação oocitária, quanto para a subsequente formação de embriões qualificados para implantação, processos estes que envolvem, por exemplo, as técnicas de coleta dos oócitos, um meio de cultivo adequado e uma fecundação com menor estresse oxidativo. Sendo assim, a MIV é uma etapa essencial na otimização da produção *in vitro* de embriões (PIVE) de diversas espécies (Botigelli *et al.*, 2018; Pioltine *et al.*, 2021; Dellaqua *et al.*, 2023b).

Entretanto, a qualidade oocitária ainda é um fator limitante para a FIV, pois os oócitos maturados *in vitro* apresentam menor competência para serem fecundados que aqueles maturados *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002). Isto pode ser explicado pela remoção antecipada do COC de seu ambiente folicular, o que pode provocar a retomada espontânea da meiose devido à ausência de sinalizações inibidoras que estão presentes no fluido folicular (Gilchrist, 2011), resultando na precipitação da maturação nuclear e descompasso com a maturação citoplasmática (Gilchrist, 2011).

Nesse sentido, busca-se por meios de cultivo que tenham maior semelhança com o ambiente fisiológico, de forma que os componentes sinalizem os processos celulares no momento ideal, o que resultaria em uma melhor sincronia entre os processos da cascata de maturação oocitária. *In vivo*, esse processo é induzido pelo pico de hormônio luteinizante (LH) que estimula a ovulação e a luteinização dos folículos pré-ovulatórios (Richards *et al.*, 1998), promove a expansão das células do *cumulus* (CCs), a maturação oocitária e a ruptura folicular (Richards *et al.*, 2002; Noma *et al.*, 2011). O pico de LH induz a expressão de fatores de crescimento epidermais (“EGF-like factors”) nas células da granulosa, dentre os quais destacam-se a ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG), betacelulina (BTC) (Conti *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2016). A família dos EGFs é composta pelo EGF e os EGF-likes, proteínas que por meio de ligações a receptores específicos na superfície celular são capazes de ativar vias de sinalização e promover o crescimento e a divisão celular (Harris *et al.*, 2003). Nos mamíferos, o pico de LH estimula a expressão dos EGF-likes por meio de receptores que se encontram nas células da granulosa (GC) (Lawrence *et al.*, 1980; Russell and Robker, 2007), mas não estimula diretamente as CC, pois estas não possuem receptores para o LH, e, por isso, dependem de indutores para produzirem esses peptídeos (Richani *et al.*, 2013). Uma vez que os EGF-likes são sintetizados, eles ativam seus receptores (EGFR) nas CCs e, por meio da via

MAPK/ERK, estimulam a retomada da meiose, a maturação do oócito e a expressão de genes promotores da expansão do *cumulus* (Freimann *et al.*, 2004). Em especial, a neuroregulina 1 (NRG1), um tipo de EGF-*like*, atua na modulação de vias de sinalização induzidas pelos EGFR presentes nas CCs, principalmente AREG, o que promove ajustes temporais da retomada meiótica (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014; Shimada *et al.*, 2016).

Nos protocolos atuais de MIV em bovinos, utiliza-se o hormônio folículo estimulante (FSH), o qual age como indutor da maturação oocitária *in vitro* por aumentar a expressão de EGFs, como a AREG, diretamente nas CCs (Freimann *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2013), as quais apresentam seus receptores específicos (FSHR). A AREG desencadeia a quebra da vesícula germinativa e retomada da meiose e seu uso inadequado pode gerar descompasso entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática do oócito (Gilchrist, 2011).

A associação de agentes fisiológicos durante a MIV pode resultar em melhor competência oocitária e desenvolvimento embrionário. Pesquisas recentes revelaram que a NRG1 e a AREG atuam juntamente durante a MIV de COCs de camundongos (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014). Esses estudos demonstraram que a combinação desses fatores regula de maneira mais efetiva as alterações necessárias para a retomada da meiose (Shimada *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram observados em oócitos bovinos, nos quais a adição da NRG1 no meio de maturação resultou em embriões de melhor qualidade (Dellaqua *et al.*, 2023b). Além disso, este estudo mostrou que o uso de NRG1 durante a MIV induzida com AREG modulou a expressão dos genes relacionados a maturação oocitária, uma vez que a NRG1 diminuiu a expressão de *EGFR*, gene fortemente relacionado com a retomada da meiose (Abbassi *et al.*, 2021) e aumentou a expressão de *NPR2*, responsável pela produção de cGPM que, após ser transportado das CCs para o oócito, mantém a parada meiótica (Wang (Wang *et al.*, 2013).

Em colaboração com o Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão, na Itália, desenvolvemos anteriormente um sistema de cultivo MIV em duas fases, chamado de Sistema Folículo (SF; Soares *et al.*, 2017). O SF foi projetado para fornecer um ambiente que replica as condições encontradas nos folículos pré-ovulatórios. Na primeira fase, denominada pré-MIV, o COC é exposto a um ambiente contendo peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), o qual atua na manutenção da parada meiótica em VG ao aumentar a produção de GMPc nas CCs (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Franciosi *et al.*, 2014). Essa etapa tem como objetivo permitir que ocorram as alterações necessárias no citoplasma do oócito antes da maturação final, o que inclui o retardo da retomada meiótica e o prolongamento da comunicação entre cumulus e oócito, de modo que resulte em melhor

sincronia na maturação nuclear, citoplasmática e molecular do oócito, gerando melhores resultados na PIVE (Gilchrist *et al.*, 2016). Na segunda fase, chamada de fase MIV, ocorre a ativação da cascata de maturação nas CCs por meio da adição de agentes fisiológicos, como AREG, IGF-1, baixa concentração de FSH e hormônios esteroides (Soares *et al.*, 2017).

A abordagem de duas fases no cultivo *in vitro* busca replicar de forma mais precisa as condições fisiológicas da maturação do COC, visando melhorar a qualidade e a eficiência do processo. Com o intuito de simular ainda mais os eventos que ocorrem *in vivo* durante a maturação oocitária, dividimos a fase MIV do SF em duas etapas, nomeada SF sequencial, a fim de induzir a ativação da cascata de maturação de forma sequencial, mimetizando o sistema *in vivo*. Nesse processo, o oócito é exposto a um meio de cultivo com baixas dosagens de FSH na fase inicial da MIV e, em seguida, a associação AREG-NRG1 é utilizada para completar o processo de maturação.

Dessa forma, este projeto teve o intuito de avaliar o impacto do cultivo pré-MIV associado à indução sequencial da maturação oocitária, na tentativa de melhorar a competência do oócito para a produção embrionária *in vitro*.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da inclusão da indução sequencial no sistema folicular (SF) para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a qualidade da maturação aferida pela expansão do cumulus, bem como sobre a produção e qualidade embrionária após a FIV.

3. HIPÓTESE

A inclusão da indução sequencial no sistema folicular (SF) para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos melhora a expansão do cumulus após a MIV, bem como a produção e qualidade embrionária após a FIV.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

Os efeitos da MIV sequencial foram testados em grupos de 20-25 COCs submetidos a três diferentes tratamentos após uma fase de pré-MIV comum a todos os grupos: (1) MIV

induzida apenas com FSH (grupo FSH), (2) MIV induzida com o SF (grupo SF) e (3) MIV com o SF sequencial (grupo SFseq).

Os COCs foram pré-maturados *in vitro* durante 9 horas e posteriormente submetidos a MIV. Após 24 horas de MIV, os COCs foram submetidos a FIV e ao cultivo *in vitro* (CIV). Ao final de 7 dias de cultivo, a taxa de produção embrionária foi avaliada e foi realizada a coloração com Hoechst para a contagem de células embrionárias totais. Foram realizadas 5 réplicas independentes totalizando 118, 125 e 110 COCs nos grupos FSH, SF e SFseq, respectivamente. O delineamento experimental é ilustrado na figura 1.

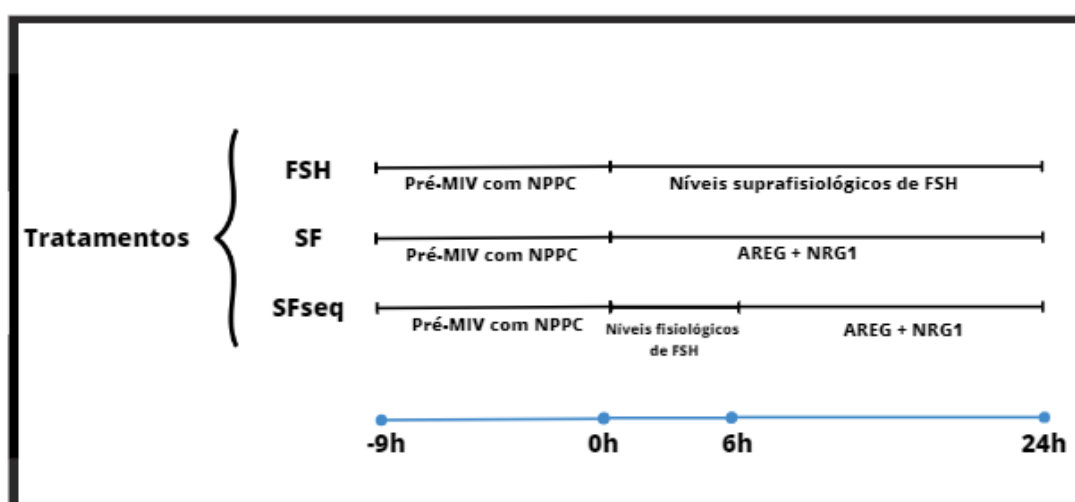


Fig. 1. Representação esquemática do sistema de maturação proposto com os principais indutores. A pré-MIV foi realizada com NPPC. Já a MIV foi realizada com os tratamentos FSH (convencional), SF (MIV do Sistema Folicular), SFseq (MIV sequencial). Ao final da maturação, os COCs foram submetidos a FIV e CIV.

4.2 Obtenção dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) *post mortem*

Os COCs foram coletados de ovários bovinos obtidos de abatedouro local. Os ovários foram conduzidos ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) aquecida à 37°C e utilizados imediatamente. Após higienização dos mesmos, a aspiração do fluido folicular dos folículos com diâmetro de 2 a 8 mm foi realizada com o uso de seringa de 10 mL e agulha 19G. O fluido folicular obtido foi depositado em tubos de 15mL e estes foram mantidos em banho maria a 37°C até a formação de um pellet. Após sedimentação no líquido folicular, os COCs foram recuperados e classificados como: grau I, II ou III de acordo com suas características celulares (Khurana and Niemann, 2000). Somente COCs com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de CCs compactas foram utilizados (grau I e II).

4.3 Pré-maturação oocitária *in vitro*

Após a lavagem em meio TCM199 com HEPES contendo BSA (4 mg/mL) e amicacina (75 µg/mL), os COCs foram agrupados e transferidos para a placa de pré-maturação. As placas de 4 poços (NUNC®) foram previamente preparadas com 400 µL de meio composto por TCM 199 com bicarbonato suplementado com piruvato (22 µL/mL), amicacina (75 µg/mL) e albumina sérica bovina (BSA, 4 mg/mL); acrescido de NPPC (100 nM), estradiol (500 ng/mL), progesterona (50 ng/mL), r-hFSH (0,0001 UI/mL) e IGF-1 (10 ng/mL). Após a transferência dos COCs, as placas foram colocadas em incubadora à temperatura de 38,5°C e umidade saturada do ar com 5,5% de CO₂.

4.4 Maturação oocitária *in vitro*

Ao final de 9h da pré-MIV, os COCs foram transferidos para as placas de MIV conforme os grupos descritos acima. O meio de maturação base para todos os experimentos foi composto por TCM 199 com bicarbonato suplementado com piruvato (22 µL/mL), amicacina (75 µg/mL) e albumina sérica bovina (BSA, 4 mg/mL), acrescido de r-hFSH (0,1 UI/mL) para o grupo FSH, ou acrescido de r-hFSH (0,01 UI/mL), AREG (100 ng/mL), IGF-1 (10 ng/mL), 17β-oestradiol (50 ng/mL), progesterona (150 ng/mL) e NRG1 (1 ng/mL) para os grupos SF e a segunda etapa do tratamento SFseq. A primeira etapa do tratamento SFseq foi realizada durante 6 primeiras horas com meio idêntico ao anterior, exceto pela ausência de AREG e posteriormente, cultivados por mais 16h em meio SF completo. Após a transferência dos COCs, as placas foram colocadas em incubadora à temperatura de 38,5°C e umidade saturada do ar com 5,5% de CO₂. Os COCs alocados nos grupos FSH e SF foram maturados por 24h contínuas, enquanto aqueles alocados no grupo SFseq tiveram as devidas trocas de meio de cultura.

Ao término da MIV, os COCs foram classificados quanto a expansão das CCs na ordem crescente de expansão em grau I, II e III, os quais avaliam a compactação e quantidade de camadas das CCs (Machado *et al.*, 2015). Posteriormente, os COCs foram submetidos à FIV.

4.5 Fecundação *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV)

Para realizar a FIV foi utilizado protocolo baseado em Dellaqua *et al.* (2023b). Os espermatozoides criopreservados foram separados em 45% - 90% de gradiente de Select

Sperm[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), contados e adicionados nos diferentes poços na concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL. Os COCs e os espermatozoides foram incubados em meio FIV[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) durante 18h a 38.5°C em 5,5% de CO₂ em ar umidificado. Após este período, os prováveis zigotos foram lavados e as CCs removidas por agitação em vórtex. Posteriormente, os zigotos foram transferidos para o meio de cultivo embrionário CIV[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) enriquecido com 2,5% de SFB. O cultivo foi realizado em incubadora com mistura gasosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ a 38.5°C em ar umidificado. No terceiro dia de cultivo (D3) observou-se a taxa de clivagem dos embriões formados sob microscópio estereoscópico. Ao final do período de sete dias completos, no dia 8 de cultivo (D8), a taxa de blastocistos foi avaliada em microscópio estereoscópico e os embriões foram classificados em não expandidos, expandidos e eclodidos (Jakobsen *et al.*, 2006). Posteriormente, os embriões foram fixados em metanol 60%, montados entre lâmina e lamínula com glicerol e Hoechst 33342, e os núcleos celulares foram contados sob um microscópio de fluorescência após coloração.

4.6 Análise estatística

Os efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros descritos acima foram analisados por meio do software JMP (SAS Institute). Os dados foram transformados em arco-seno e logaritmo, quando necessário, e avaliados quanto à normalidade (Shapiro Wilk). Caso a distribuição dos dados fosse normal ou não-normal, os efeitos foram testados por ANOVA ou Kruskal-Wallis, e as médias foram comparadas por Tukey ou Mann-Whitney, respectivamente. Os resultados estão apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Ao observar a expansão das CCs, notamos que os tratamentos SF e SFseq tiveram maiores quantidades de COCs que atingiram a máxima expansão (grau 3) comparados ao grupo FSH, entretanto, ambos não diferiram entre si (Fig 2a).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a clivagem embrionária (Fig. 2b), assim como nas taxas de blastocistos (Fig 2c) e de embriões expandidos e eclodidos

(Fig 2d,e), embora o SFseq tenha proporcionado taxas de produção embrionária numericamente superiores aos demais grupos.

A respeito da contagem do número total de células embrionárias, observamos que o tratamento SFseq produziu embriões com maior número de células em relação ao tratamento SF, mas não diferiu estatisticamente do grupo FSH quanto a esse parâmetro (Fig. 2f).

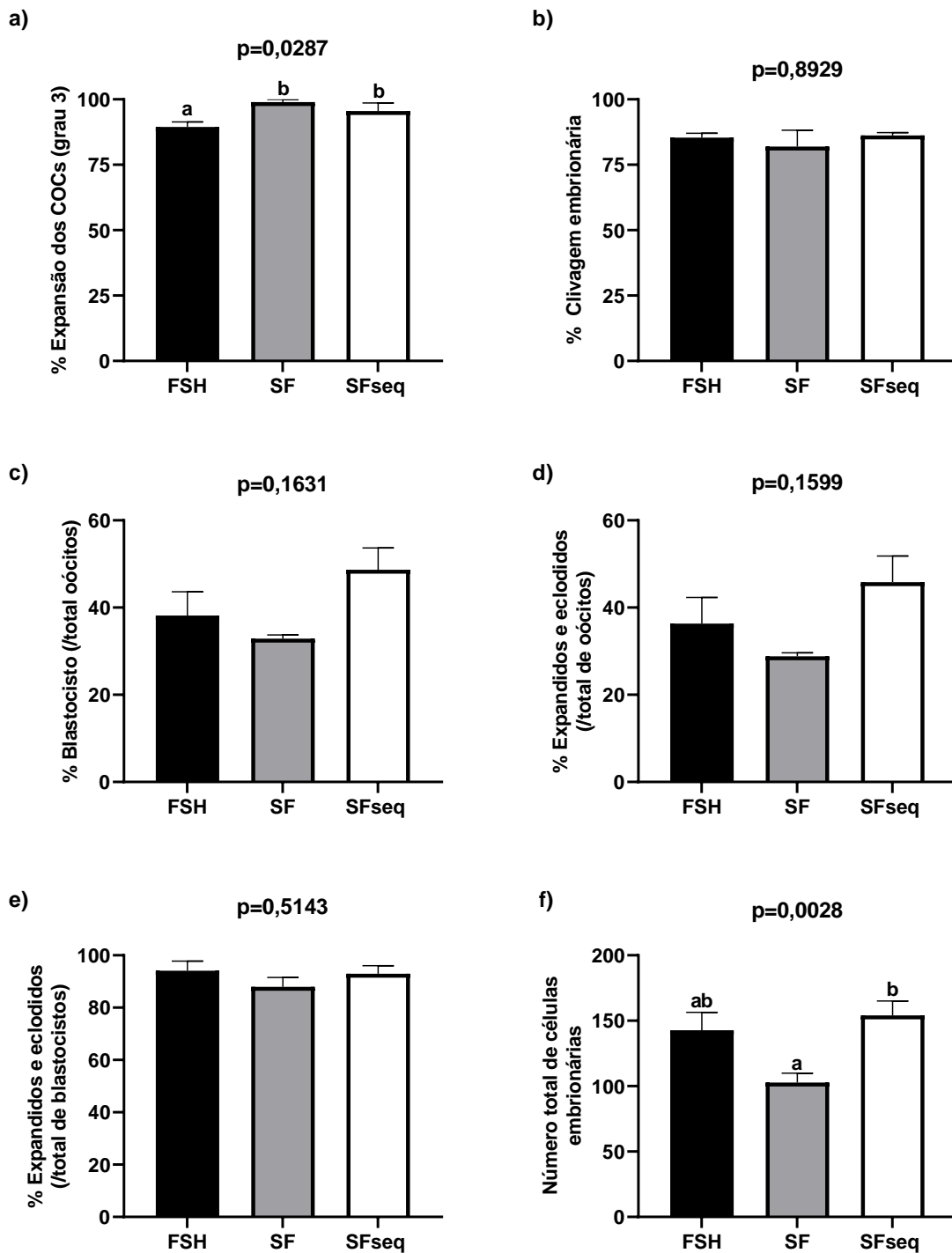


Figura 2. Efeitos da pré-MIV seguida de MIV sequencial sobre a PIVE. **a)** Porcentagem dos COCs que atingiram o grau III de expansão após o período de 24h de MIV. **b)** Porcentagem de embriões clivados no D3 após a CIV. **c)** Porcentagem de embriões que atingiram o estágio de blastocisto no D8 em relação ao número total de oócitos cultivados. **d)** Porcentagem de blastocistos expandidos ou eclodidos no D8 em relação ao total de oócitos cultivados e em relação ao total de blastocistos (**e**). **f)** Número total de células embrionárias no D8.

6. DISCUSSÃO

A maturação *in vitro* realizada em duas etapas, pré-MIV e MIV, já foi testada em outros estudos em bovinos com o intuito de prolongar a parada meiótica e aumentar o tempo de comunicação entre *cumulus* e oócito, favorecendo a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática, e, conseqüentemente a maturação oocitária e a produção embrionária após a FIV (Gilchrist *et al.*, 2016; Buratini *et al.*, 2021a). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa investigaram a MIV em duas etapas, levando à proposição de uma estratégia denominada Sistema Folicular (SF, Soares *et al.*, 2017). O presente estudo teve como foco o aperfeiçoamento da segunda fase do Sistema Folicular em que a cascata de maturação deve ser induzida. Para tanto, testamos a inclusão da indução sequencial com FSH e AREG na fase MIV do SF.

Em relação à taxa de expansão das CCs (Fig 2a), os tratamentos SF e SFseq não diferiram entre si, mas proporcionaram taxas maiores de COCs expandidos em relação ao FSH. Um estudo prévio em oócitos de camundongos mostrou que o uso de AREG e NRG1 durante a MIV melhora a ativação de genes indutores da expansão do *cumulus* (Noma *et al.*, 2011). A ativação da cascata de maturação ocasionada pela sinalização EGFR permite a expressão de genes relacionados com a expansão das CCs, principalmente de prostaglandina sintase 2 (*PTGS2* ou *COX2*), hialurona sintase 2 (*HAS2*), fator de necrose tumoral 6 (*TNFAIP6* ou *TSG6*) e pentraxina 3 (*PTX3*, Shimada *et al.*, 2006; Assidi *et al.*, 2010; Prochazka *et al.*, 2012). As proteínas traduzidas por estes genes interagem no meio extracelular para que ocorra formação da matriz extracelular das CCs e a conseqüente expansão do *cumulus*. Os EGF-likes, como AREG e NRG1, atuam nas vias ativadas por EGFR e agem diretamente na dinâmica meiótica e expansão do *cumulus* (Park *et al.*, 2004). Assim, a associação AREG-NRG1 durante a MIV neste estudo, de maneira direta (grupo SF) ou sequencial (grupo SFseq), pode ter proporcionado melhor ativação das vias relacionadas, resultando em taxas maiores de COCs expandidos. Além disso, estudos anteriores sugerem que a expansão do *cumulus* está diretamente relacionada ao sucesso do desenvolvimento embrionário (Chen *et al.*, 1993; Gutnisky *et al.*, 2007).

Ao avaliarmos a clivagem embrionária, analisada no D3 da CIV, não observamos diferenças entre os tratamentos. Esta ausência de diferença pode refletir que os tratamentos apresentam desempenhos semelhantes quanto à capacidade de promover o desenvolvimento embrionário até a clivagem. Em relação a produção de blastocistos, o tratamento SFseq não promoveu taxas significativamente superiores, entretanto, a presença de superioridade

numérica, associada ao número de réplicas experimentais possivelmente insuficiente, estimula a continuidade do estudo.

Por outro lado, a inclusão da indução sequencial aumentou a qualidade embrionária aferida pelo número de células embrionárias em relação ao grupo SF (Fig. 2f). Este resultado indica que a consideração deste princípio fisiológico é válida para a melhoria da MIV/PIV. É importante destacar que a quantidade de células na massa celular interna é um fator determinante na qualidade do embrião e isso já vem sendo comprovado em diversos estudos (Farin *et al.*, 1997; Farin *et al.*, 2001; Farin *et al.*, 2007). Jakobsen *et al.* (2006) constatou que os blastocistos com maior quantidade de células embrionárias foram considerados morfológicamente normais e de boa qualidade, além de se desenvolverem mais rápido que aqueles morfológicamente inferiores, o que mostra a relevância desse parâmetro para a análise dos embriões resultantes. Além disso, o número de células pode refletir na habilidade do embrião em progredir no desenvolvimento (Kong *et al.*, 2016). Na reprodução humana, por exemplo, a análise da quantidade celular auxilia na seleção de embriões e contribui em maiores taxas de implantação e nascimento (Kong *et al.*, 2016). Por outro lado, baixas taxas de implantação pós-FIV foram relacionadas à seleção de embriões com proliferação anormal durante o cultivo (Hlinka *et al.*, 2012; Keefe, 2020; Popovic *et al.*, 2020; Shahbazi *et al.*, 2020), ressaltando a importância do acompanhamento durante toda a progressão celular nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

Assim, esses resultados estimulam a continuidade dos nossos estudos testando doses de FSH na primeira etapa do cultivo sequencial que eventualmente reflitam mais precisamente as concentrações intra-foliculares durante o pico de LH/FSH que antecede a ovulação, pois esses valores não são precisamente conhecidos na espécie/raças bovinas. Por fim, é importante relatar que o cultivo sequencial emerge das referências da fisiologia ovariana e de planejamento de modo a determinar o momento ideal para a transição entre as etapas de maturação, identificando variáveis que podem impactar sobre a eficácia dos meios de cultura. Ao observar os efeitos do meio SF sequencial de modo geral, percebe-se tal importância para a obtenção de resultados positivos na produção *in vitro* de embriões.

7. CONCLUSÃO

A indução sequencial da cascata de maturação com FSH e AREG parece beneficiar a competência oocitária durante a MIV, embora a continuidade dos estudos com aumento da replicação experimental e ajustes da dose de FSH ainda seja necessária.

8. REFERÊNCIAS

- ABASSI, L.; EL-HAYEK, S.; CARVALHO, KF.; WANG, W.; YANG, Q. Granados-Aparici S, Mondadori R, Bordignon V, Clarke HJ. Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular compartment at ovulation. **Nat Commun** 2021;**12**: 01-13.
- BARROS, RG.; LIMA, PF.; SOARES, ACS.; SANCHES, L.; PRICE, CA.; BURATINI, J. Fibroblast growth factor 2 regulates cumulus differentiation under the control of the oocyte. **J Assist Reprod Genet**, 36: 905-913, 2019.
- BEKER VAN WOUDEBERG, A.; GROLLERS-MULDERIJ, M.; SNEL, C.; JEURISSEN, N.; STIERUM, R.; WOLTERBEEK, A. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 251- 260, 2012.
- BOTIGELLI, RC.; RAZZA, EM.; PIOLTINE, EM.; FONTES, PK.; SCHWARZ, KRL.; LEAL, CLV.; NOGUEIRA, MFG. Supplementing in vitro embryo production media by NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine cumulus-oocyte complexes and embryos. **Reprod Biol**,18: 66-75, 2018.
- BURATINI, J.; DELAQUA, TT.; DAL CANTO, M.; LA MARCA, A.; CARONE, D.; MIGNINI RENZINI, M.; WEBB, R. The putative roles of FSH and AMH in the regulation of oocyte developmental competence: from fertility prognosis to mechanisms underlying age-related subfertility. **Hum Reprod Update**,28: 232-254, 2021a.
- BURATINI, J.; SOARES, A.C.S.; BARROS, R.G.; DELLAQUA, T.T.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M.M.; LUCIANO, A.M. Physiological parameters related to oocyte nuclear differentiation for the improvement of IVM/IVF outcomes in women and cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 34, n.2, p. 27- 35, 2021.
- CAIXETA, E.S.; MACHADO, M.F.; RIPAMONTE, P.; PRICE, C.; BURATINI, J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25: p. 890-899, 2013.
- CHEN, L.; RUSSEL, PT.; LARSEN, WJ. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Mol Reprod Dev**,34:87-93,1993.
- CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, AM.; OH, JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Mol Cell Endocrinol**, 356: 65-73, 2012.
- DE GEYTER, C. Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 33, p. 3- 8, 2019.
- DELLAQUA, TT.; FRANCHI, FF.; DOS SANTOS, PH.; GIROTO, AB.; NUNES, SG.; DE LIMA, VAV.; GUILHERME, VB.; FONTES, PK.; SUDANO, MJ.; DE SOUZA CASTILHO, AC. Molecular phenotypes of bovine blastocyst derived from in vitro-matured oocyte supplemented with PAPP-A. **Vet Res Commun**, 2023a.
- DELLAQUA, TT.; VIGARO, RZ.; JANINI, LCZ.; DAL CANTO, M.; RENZINI, MM.; LODDE, V.; LUCIANO, AM.; BURATINI, J. Neuregulin 1 (NRG1) modulates oocyte nuclear maturation during IVM and improves post-IVF embryo development. **Theriogenology**,195: 209-216, 2023b.
- FARIN, C.E.; HASLER, J.F.; MARTUS, N.S.; STOKES, J.E. A comparison of Menezos's B2 and tissue culture Medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 48, p. 699-709, 1997.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 97-112, 2007.

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.

FRANCHI, FF.; SATRAPA, RA.; FONTES, PK.; SANTOS, PH.; RAZZA, EM.; EMANUELLI, IP.; ERENO, RL.; MARECO, EA.; NOGUEIRA, MFG; BARROS, CM. Equine chorionic gonadotropin drives the transcriptional profile of immature cumulus-oocyte complexes and in vitro-produced blastocysts of superstimulated Nelore cows. **Mol Reprod Dev** 2019;86: 1639-1651, 2019.

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

FREIMANN, S.; BEN-AMI, I.; DANTES, A.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, p. 829-834, 2004.

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 23-31, 2011.

GILCHRIST, R.B.; LUCIANO, A.M.; RICHANI, D.; ZENG, H.T.; WANG, X.; VOS, M.D.; SUGIMURA, S.; SMITZ, J.; RICHARD, F.J.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, p. 143-157, 2016.

GUTNISKY, C.; DALVIT, GC.; PINTOS, LN.; THOMPSON, JG.; BECONI, MT.; CETIDA, PD. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. **Reprod Fertil Dev**,19:488–497, 2007.

HARRIS, R.C.; CHUNG, E.; COFFEY, R.J. EGF receptor ligands. **The EGF Receptor Family**, p. 03-14, 2003.

HE, M.; ZHANG, T.; YANG, Y.; WANG, C. Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. **Frontiers in Cell Developmental Biology**, v. 9, p. 654028, 2021.

HERRICK, JR.; BRAD, AM.; KRISHER, RL. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. **Reproduction**, 131: 289-298, 2006.

HLINKA, D.; KALATOVA, B.; UHRINOVA, I.; DOLINSKA, S.; RUTAROVA, J.; REZACOVA, J.; LAZAROVSKA, S.; DUDAS, M. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. **Physiological Research**, v. 61, p. 513-525, 2012.

JAKOBSEN, A.S.; THOMSEN, P.D.; AVERY, B. Few polyploid blastomeres in morphologically superior bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 65, p. 870- 881, 2006.

JANINI, LCZ.; DELLAQUA, TT.; MEMBRIVE, CMB.; OBA, E.; NICHI, M.; RIZZOTO, G.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Effects of anethole supplementation on bovine embryo production and quality. **Livestock Science**, 274, 2023.

KAWASHIMA, I.; UMEHARA, T.; NOMA, N.; KAWAI, T.; SHITANAKA, M.; RICHARDS, J.S.; SHIMADA, M. Targeted disruption of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. **Molecular Endocrinology**, v. 28: p. 706-721, 2014.

- KEEFE, DL. Telomeres and genomic instability during early development. **Eur J Med Genet**, 63, 2020.
- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, p. 741-766, 2000.
- KONG, X.; YANG, S.; GONG, F.; LU, C.; ZHANG, S.; LU, G.; LIN, G. The Relationship between Cell Number, Division Behavior and Developmental Potential of Cleavage Stage Human Embryos: A Time-Lapse Study. **PLoS One**, v. 11, e0153697, 2016.
- LAMPE, PD.; TENBROEK, EM.; BURT, JM.; KURATA, WE.; JOHNSON, RG.; LAU, AF. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. **J Cell Biol**, 1503-1512, 2000.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MAZIERO, R.R.D. Control of oocyte maturation. *Animal Reproduction*, v. 11, p. 150-158, 2014.
- LAWRENCE, T.S.; DEKEL, N.; BEERS, W.H. Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli oophori and granulosa cells: a comparative study. **Endocrinology**, v. 106, p. 1114- 1118, 1980.
- LEEMANS, B.; GADELLA, BM.; STOUT, TA.; DE SCHAUWER, C.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. **Reproduction**, 152: R233-R245, 2016.
- LODDE, V.; COLLEONI, S.; TESSARO, I.; CORBANI, D; LAZZARI, G.; LUCIANO, AM.; GALLI, C.; FRANCIOSI, F. A prematuration approach to equine IVM: considering cumulus morphology, seasonality, follicle of origin, gap junction coupling and large-scale chromatin configuration in the germinal vesicle. **Reprod Fertil Dev**, 31: 1793-1804, 2019.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016.
- MACHADO, MF.; CAIXETA, ES.; SUDIMAN, J.; GILCHRIST, RB.; THOMPSON, JG.; LIMA, PF.; PRICE, CA.; BURATINI, J. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro-produced embryos in cattle. **Theriogenology**, 84: 390-398, 2015.
- MAO, J.; WHITWORTH, K.M.; SPATE, L.D.; WALTERS, E.M.; ZHAO, J.; PRATHER, R.S. Regulation of oocyte mitochondrial DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during in vitro maturation affects embryo development in pigs. **Theriogenology**, v. 78, p. 887-897, 2012.
- MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P. Embryo development in mammalian species. **In International Congress Series** Vol. 1230, pp. 69-78, 2001.
- MARTINEZ, CA.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; MASIDE, C.; RAMIS, G.; CAMBRA, JM.; VAZQUEZ, JM.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GIL, MA.; MARTINEZ, EA. Exogenous Melatonin in the Culture Medium Does Not Affect the Development of In Vivo-Derived Pig Embryos but Substantially Improves the Quality of In Vitro-Produced Embryos. **Antioxidants (Basel)**, 11, 2022.
- MORRIS, LHA. The development of in vitro embryo production in the horse. **Equine Vet J**, 50: 712-720, 2018
- NEBLETT, M.F.; KIM, T.; JONES, T.L.; BAUMGARTEN, S.C.; CODDINGTON, C.C.; ZHAO, Y.; SHENOY, C.C. Is there still a role for cleavage-stage embryo transfer? *F&S Reports*, v. 2, p. 269-274, 2021.

NOMA, N.; KAWASHIMA, I.; FAN, H.Y.; FUJITA, Y.; KAWAI, T.; TOMODA, Y.; MIHARA, T.; RICHARDS, J.S.; SHIMADA, M. LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. **Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 104-116, 2011.

OKAMOTO, A.; NAMAMURA, Y.; SHIMADA, M.; YASUSHITA, Y. Neurotensin (NTS) expressed in porcine cumulus cells increases expression of EGFR receptor (EGFR) and induces sustained activation of EGFR-ERK 1/2 system. **Japan Breeding Biology Society**, 2018.

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.C.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, p. 682-684, 2004.

PIOLTINE, E.M.; COSTA, C.B.; BARBOSA LATORRACA, L.; FRANCHI, F.F.; DOS SANTOS, P.H.; MINGOTI, G.Z.; DE PAULA-LOPES, F.F.; NOGUEIRA, M.F.G. Treatment of in vitro-Matured Bovine Oocytes With Tauroursodeoxycholic Acid Modulates the Oxidative Stress Signaling Pathway. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 623852, 2021.

POPOVIC, M.; DHAENENS, L.; BOEL, A.; MENTEN, B.; HEINDRYCKX, B. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma. **Hum Reprod Update**, 26: 313-334, 2020.

RICHANI, D.; RITTER, L.J.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Mode of oocyte maturation affects EGF-like peptide function and oocyte competence. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, p. 500-509, 2013.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L.L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 69-92, 2002.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L.; DAJEE, M.; ALLISTON, T.N. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 154, p. 47-54, 1998.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, PAT.; BOLAND, MP.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, 61: 234-248, 2002.

RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v. 13: p. 289-312, 2007.

SHAHBAZI, MN.; WANG, T.; TAO, X.; WEATHERBEE, BAT.; SUN, L.; ZHAN, Y.; KELLER, L.; SMITH, GD.; PELLICER, A.; SCOTT, RT. Developmental potential of aneuploid human embryos cultured beyond implantation. **Nat Commun**, 11: 1-15, 2020.

SHIMADA, M.; UMEHARA, T.; HOSHINO, Y. Roles of epidermal growth factor (EGF)- like factor in the ovulation process. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 15, p. 201-216, 2016.

SHIMADA, M.; YAMASHITA, Y. The Key Signaling Cascades in Granulosa Cells during Follicular Development and Ovulation Process. **Journal of Mammalian Ovarian Research**, v. 28, p. 25-31, 2011.

SOARES, A.C.S.; LODDE, V.; BARROS, R.G.; PRICE, C.A.; LUCIANO, A.M.; BURATINI, J. Steroid hormones interact with natriuretic peptide C to delay nuclear maturation, to maintain oocyte-cumulus communication and to improve the quality of in vitro-produced embryos in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 2217- 2224, 2017.

VON WOLFF, M. The role of Natural Cycle IVF in assisted reproduction. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 33, p. 35-45, 2019.

WANG, Y.; KONG, N.; LI, N.; HAO, X.; WEI, K.; XIANG, X.; XIA, G.; ZHANG, M. Epidermal growth factor receptor signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and meiotic resumption in mouse oocytes. *Endocrinology*, 154: 3401-3409, 2013.

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

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

ZHANG, ZY.; YU, XL.; CAI, MD.; LIU, YH.; LIU, JQ.; ZHAO, SY.; LI, XX.; LI, YH. Relationship between bovine oocytes developmental competence and mRNA expression of apoptotic and mitochondrial genes following the change of vitrification temperatures and cryoprotectant concentrations. *Cryobiology*, 97: 110-122, 2020.