

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a
partir de 24/06/2022.



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeito do IGF-1 e da PAPP-A sobre aspectos do
metabolismo lipídico e estresse oxidativo de oócitos e
embriões bovinos produzidos *in vitro***

FERNANDA FAGALI FRANCHI

**Botucatu – SP
2020**

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeito do IGF-1 e da PAPP-A sobre aspectos do
metabolismo lipídico e estresse oxidativo de oócitos e
embriões bovinos produzidos *in vitro***

FERNANDA FAGALI FRANCHI

**Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação do Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista –
UNESP, para a obtenção do título de
Doutora em Farmacologia e Biotecnologia**

Orientador: Anthony César de Souza Castilho

**Botucatu – SP
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Franchi, Fernanda Fagali.

Efeito do IGF-1 e da PAPP-A sobre aspectos do metabolismo lipídico e estresse oxidativo de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro / Fernanda Fagali Franchi. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Anthony César de Souza Castilho

Capes: 21000000

1. Bovino. 2. Lipídios - Metabolismo. 3. Fertilização in vitro. 4. Técnicas de maturação in vitro de oócitos.

Palavras-chave: EROs; Fator de crescimento; IGF-1 livre; IGFBP; Pappalisina.

Nome do Autor: Fernanda Fagali Franchi

Título: EFEITO DO IGF-1 E DA PAPP-A SOBRE ASPECTOS DO METABOLISMO LIPÍDICO E ESTRESSE OXIDATIVO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

Presidente e Orientador

Unoeste – Presidente Prudente – São Paulo

Prof. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Membro

Departamento de Produção e Saúde Animal (FMVA)

Unesp – Araçatuba – São Paulo

Prof. Dr. Mateus José Sudano

Membro

Centro de Ciências Naturais e Humanas

UFABC – Santo André – SP

Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

Unesp – Botucatu – SP

Dra. Raquel Zaneti Puelker

Membro

Progest Biotecnologia em Reprodução Animal – Botucatu – SP

Data da defesa: 15 de junho de 2020.

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Mario e Eliana,
E aos meus tios, Augusto e Regina.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Anthony César de Souza Castilho pela confiança, por ter auxiliado no meu crescimento científico, no mestrado e também no doutorado, contribuindo dia-a-dia, “tijolinho por tijolinho”, na construção da pesquisadora que sou hoje e, principalmente, por acreditar em mim (muitas vezes, mais que eu mesma). À minha mãe Eliana, meu pai Mario e meus irmãos Renata e Raul, minha família, que estiveram sempre me incentivando e comemorando, junto a mim, cada pequena conquista nesses dez anos de estudo para chegar até aqui. Ao Jin, por ser meu companheiro incondicional de jornada, sempre me apoiar e por ser meu ponto de equilíbrio. À minha amiga, minha dupla (Teco), irmã que a vida me deu, Priscila Helena, que não deixou minha “coroa cair” e foi um dos presentes que a pós me trouxe. Aos meus amigos de vida e de trabalho, Carolzinha, Sarah, Thaisy, Elisa, Eduardo, Patricia e Alan pela amizade e por dividirem comigo experiências, experimentos e contas de bar durante todos esses anos, tornando a vida mais leve. Às minhas amigas Camila, Daniele e Thais pela amizade sincera e pelos encontros sempre prazerosos. À Raquel pelo companheirismo e pelo serviço de “salva-vidas” prestado ao nosso grupo de pesquisa. Aos meus companheiros de laboratório, Ana, Vinícius, Tainan, Cris, Erika, Laís, Fábio e Luiz pelos momentos de descontração, pelas conversas e discussões “acaloradas”. Às antigas companheiras de laboratório Debora, Rubia, Mariana e Ester, que me ensinaram o começo de tudo e que me incentivaram e me inspiraram a continuar nessa carreira. Ao professor Di Stasi, pela confiança e por ter me acolhido em seu laboratório. Aos funcionários do departamento de farmacologia, Cris, Paulão, Luiz e Hélio pelo auxílio e apoio oferecido. A Jan, pelo acolhimento e todo carinho dedicado a mim. À seção de pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial ao Davi. Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu pelo tempo dedicado as

disciplinas e por toda atenção disponibilizada. Aos membros da banca pela disponibilidade e por contribuírem com esse trabalho. A CAPES (cód. 001) pela concessão de bolsa, e a FAPESP (2013/11480-3; 2013/ 11480-3; 2015/04505-5; 2016/22812-5; 2017/19679-4; 2018/06454-7) e CNPq (403063/2016-7) pelo suporte financeiro para realização desse trabalho.

RESUMO

A proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) é uma metaloprotease, que tem como função aumentar a biodisponibilidade do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1), um peptídeo com diversas funções em prol do bom desenvolvimento oocitário e embrionário. Assim, a temática principal dessa tese foi utilizar a PAPP-A como um potencializador dos efeitos atribuídos ao IGF-1 durante a PIVE de bovinos. No primeiro artigo, investigamos o efeito da adição de PAPP-A durante a MIV suplementada com soro fetal bovino (SFB). Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram maturados *in vitro* por 24 horas na presença ou ausência de SFB e, posteriormente, foram fertilizados e cultivados *in vitro*. Analisamos o conteúdo lipídico dos oócitos e blastocistos usando o corante Sudan-Black B, a taxa de blastocistos produzidos e a expressão gênica de 96 genes por RTqPCR. Não houve diferença no conteúdo lipídico dos oócitos e blastocistos avaliados, nem na taxa de blastocistos produzidos. No entanto, a presença de PAPP-A durante a MIV diminuiu a expressão de 22 genes relacionados à síntese de lipídeos, apoptose e estresse celular e qualidade embrionária nos blastocistos produzidos. No segundo artigo, os CCOs foram maturados (tratamento na MIV) ou os embriões cultivados (tratamento no CIV) por 24h com adição de IGF-1, IGF-1/PAPP-A, ou na ausência de ambos, em um ambiente estresse-induzido pela presença de menadiona. Avaliamos nos oócitos a progressão da meiose, concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o potencial de membrana mitocondrial por técnicas de coloração utilizando sondas específicas. Também analisamos as concentrações de glutathiona total (GSH) nos CCOs, blastocistos e meios de MIV e CIV, além da taxa de blastocistos produzidos e a expressão gênica dos embriões por RTqPCR. A combinação IGF-1/PAPP-A resultou nas menores concentrações de EROs em oócitos e blastocistos e também modulou positivamente nos

embriões genes envolvidos na defesa antioxidativa, metabolismo lipídico e qualidade embrionária, além de aumentar a taxa de blastocistos produzidos quando utilizadas na CIV. Assim, concluímos que o uso da PAPP-A, durante a PIVE de bovinos, foi efetivo como uma estratégia para maximizar as ações mediadas por IGF-1. Especificamente, reiteramos que a combinação IGF-1/PAPP-A teve efeitos mais marcantes, potencializando a proteção antioxidativa e a qualidade embrionária, além de aumentar quantitativamente o número de blastocistos produzidos em um ambiente estresse-induzido.

Palavras-chave: Pappalisina, fator de crescimento, EROs, IGFPB, IGF-1 livre, biodisponibilidade, PAPP-A.

ABSTRACT

Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a metalloprotease which role is to increase insulin-like growth factor type 1 (IGF-1), a peptide with several beneficial functions for oocyte and embryo development. Thus, the thesis main subject was using the PAPP-A as an enhancer of IGF-1 attributed-effects during bovine in vitro production. In the first article, we investigated the effects of PAPP-A addition during IVM supplemented with fetal bovine serum (FBS). The cumulus-oocyte complexes (COCs) were in vitro matured for 24 hours in the presence or absence of FBS, and after, in vitro fertilized and cultured. We analyzed the oocytes and blastocysts lipid content by Sudan-Black B staining, the blastocysts yield, and the expression of 96 genes by RTqPCR. There was no difference in oocytes and blastocysts lipid content or in the blastocysts yield. However, the PAPP-A addition during IVM downregulated the expression of 22 genes related to lipid synthesis, apoptosis and cell stress, and embryonic quality in the blastocysts. In the second article, the COCs were matured (IVM treatment) or the embryos were cultured (IVC treatment) for 24 hours with IGF-1, IGF-1/PAPP-A addition, or in absence of both at a stress environment-induced by the menadione addition. We assessed the meiosis progression, reactive oxygen species (ROS) concentration and mitochondrial membrane potential levels in the oocytes using staining techniques. We also analyzed the concentrations of total glutathione (GSH) in COCs, blastocysts, and IVM and IVC media, besides the blastocysts yield and the expression of 96 genes by RTqPCR. The IGF-1/PAPP-A combination showed the lower ROS concentrations in oocytes and blastocysts and also positively modulated genes involved in antioxidative defense, lipid metabolism, and embryonic quality, besides increasing the blastocysts yield when used in IVC. Thus, we conclude the PAPP-A uses during bovine IVP was effective to improve the IGF-1 mediated-actions. Specifically,

the IGF-1/PAPP-A shows the highlight effects, increasing antioxidative protection and embryonic quality, besides the number of blastocysts in a stress-induced environment.

Keywords: pappalysin, growth factor, ROS, IGFBP, free IGF-1, bioavailability, PAPP-A.

SUMÁRIO

PREFÁCIO	13
CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Sistema IGF: Ações do IGF-1 durante o desenvolvimento oocitário e embrionário....	18
2.2 PAPP-A: função no sistema IGF	20
2.3 Estresse oxidativo: implicações na produção in vitro de embriões.....	22
2.4 IGF-1: ação antioxidante.....	24
2.5 IGF-1 e metabolismo lipídico	25
Objetivo	28
Hipóteses	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO II	
MOLECULAR PHENOTYPES OF BOVINE BLASTOCYST DERIVED FROM IN VITRO-MATURED OOCYTE SUPPLEMENTED WITH RECOMBINANT PAPPALYSIN-1	35
Abstract.....	36
1. Introduction.....	37
2. Material and methods.....	39
3. Results.....	43
4. Discussion	48
5. References.....	51
CAPÍTULO III	
NEW APPROACH USING IGF-1 COMBINED WITH PAPP-A DURING BOVINE IN VITRO EMBRYO PRODUCTION: COULD THIS SYSTEM ENHANCE IGF-1 ANTIOXIDATIVE ROLE?	56
Abstract.....	57
1. Introduction.....	58
2. Material and methods.....	59
3. Results.....	65
4. Discussion	71
5. References.....	76
Supplementary Material (Table S1)	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO	89

PREFÁCIO

A presente tese a ser defendida pelo o programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia se encontra dividida em quatro sessões. A primeira, denominada **Capítulo I**, compreende a introdução e revisão da literatura, que descrevem o contexto e a problemática relacionada com este trabalho de maneira mais profunda e detalhada. As duas partes subsequentes, **Capítulo II - “Molecular phenotypes of bovine blastocyst derived from *in vitro*-matured oocyte supplemented with recombinant pappalysin-1”** e **Capítulo III - “New approach using IGF-1 combined with PAPP-A during bovine *in vitro* embryo production: could this system enhance IGF-1 antioxidative role?”**, correspondem a duas propostas de manuscritos a serem submetidos como artigos resultantes do trabalho realizado nos periódicos “Theriogenology” e “Biology of Reproduction”, respectivamente. Por fim, a sessão **“Considerações Finais”** compreende as conclusões gerais (descrevendo de forma sucinta os resultados obtidos).

Conforme normas do programa de Pós-graduação, o presente exemplar consiste na versão definitiva da tese a ser encaminhada à biblioteca e que fará parte do conjunto de publicações do Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP. No entanto, ambos os manuscritos aqui apresentados estão no prelo, mas não comprometidos com a publicação em quaisquer periódicos, estando, assim, passíveis de correções e modificações por parte da banca de defesa.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) é uma metaloprotease, cuja função é a modulação da biodisponibilidade dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). Essa proteína, por meio da reação de hidrólise, cliva as proteínas ligadoras de IGFs (IGFBPs), aumentando as concentrações desse peptídeo livre, sua forma bioativa (Laursen, et al. 2001, Lawrence, et al. 1999, Mazerbourg, et al. 2003, Monget, et al. 2003, Rivera and Fortune 2003). Essas proteínas, e a dinâmica dos mecanismos envolvidos em seu funcionamento, constituem o sistema IGF.

Esse sistema está presente durante o desenvolvimento oocitário e embrionário bovino. O receptor IGF-1R está presente em oócitos e embriões, e o ligante, IGF-1, é produzido pelas células da granulosa (Bao, et al. 1995, Sirotkin, et al. 1998) e encontrado no soro, no fluido folicular, e nas células ovidutais e uterinas (Echternkamp, et al. 1990, Spicer, et al. 1992, Spicer, et al. 1988, Yaseen, et al. 2001). No entanto, durante a produção *in vitro* de embriões (PIVE) há perda de contato dos oócitos e embriões com esses ambientes, que parecem ser as fontes de IGF-1 durante o desenvolvimento oocitário e embrionário.

Outra desvantagem é que os processos *in vitro* também geram maiores concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs; Nasr-Esfahani, et al. 1990) do que *in vivo*. A alta concentração de EROs pode levar a indução da peroxidação lipídica ligada ao bloqueio da divisão celular (Nasr-Esfahani, et al. 1990, Noda, et al. 1991), danos na atividade mitocondrial (Richter, et al. 1995, Roth 2018) e modificações no DNA, como a fragmentação do material nuclear (Birben, et al. 2012), podendo ser prejudicial ao desenvolvimento de oócitos e embriões (Kala, et al. 2017). Assim, a

adição de substâncias antioxidantes durante a PIVE pode ser uma estratégia para diminuir os danos causados pelas concentrações excessivas de EROs.

Em roedores e bovinos, a adição de substâncias oxidativas, como o H_2O_2 , ou que induzem a produção de EROs, como a menadiona (Monks, et al. 1992, Nutter, et al. 1992) durante a CIV, diminuíram a taxa de blastocistos produzidos e aumentaram o número de células apoptóticas nesses embriões, mas a adição de IGF-1 restaurou as taxas de embriões produzidos e reduziu apoptose celular, apesar de não reduzir diretamente a concentração de EROs nesses embriões (Kurzawa, et al. 2004, Moss, et al. 2009).

Outro processo importante para o desenvolvimento dos oócitos e embriões que parece ser modulado pelo IGF-1 é o metabolismo de lipídeos. Alguns estudos mostraram que concentrações de triglicerídeos em oócitos bovinos podem diminuir após a MIV (Cetica, et al. 2002, Ferguson and Leese 1999, Sturmey and Leese 2003), sugerindo que esses lipídeos podem estar sendo utilizados para geração de energia durante a maturação oocitária via β -oxidação (Paczkowski et al. 2013; Dunning et al. 2014). De fato, estudos em roedores mostraram que a terapia com IGF-1 reduziu os níveis de triglicerídeos, aumentando significativamente as concentrações de ácidos graxos livres sistêmicas (García-Fernández et al. 2008), que é a forma de lipídeo que pode ser metabolizada via β -oxidação.

Lipídeos presentes no microambiente podem ser incorporados pelos CCOs e embriões (Dunning et al. 2014) e estudos tem demonstrado que a utilização de soro fetal bovino (SFB) durante a PIVE aumenta a concentração de triglicerídeos, tanto em CCOs quanto em blastocisto (Kim et al. 2001; Del Collado et al, 2015; Sudano et al. 2011; Abe et al. 2002). Esse componente é amplamente utilizado na PIVE convencional de

bovinos, principalmente por resultar nas melhores taxas de produção de blastocistos (Sudano et al. 2011; Del Collado et al. 2015), porém o aumento do conteúdo lipídico dos embriões produzidos na presença de SFB, também resulta na diminuição da taxa de re-expansão embrionária após a criopreservação (Sudano et al. 2011). O SFB possui diversas substâncias em sua composição, dentre elas, altas concentrações de lipídeos e IGF-1 (Abe, et al. 2002, Del Collado, et al. 2015, Honegger and Humbel 1986, Kim, et al. 2001, Tu, et al. 2018). Assim, a indução do metabolismo lipídico pela ação do IGF-1 poderia aumentar a utilização de lipídeos como fonte de energia e, ainda, diminuir o conteúdo lipídico nos blastocistos produzidos, o que favoreceria protocolos de criopreservação, por exemplo.

Um estudo recente em bovinos mostrou que, a adição de PAPP-A durante a MIV aumentou a concentração de IGF-1 livre no meio de maturação, e ainda, modulou genes envolvidos com o metabolismo lipídico e estresse oxidativo nos embriões produzidos a partir dos complexos cumulus-oócito (CCOs) que foram maturados com adição de PAPP-A (Giroto, et al. 2019). No entanto, nenhum estudo investigou se a PAPP-A, devido sua função no aumento da biodisponibilidade de IGF-1, poderia funcionar como um potencializador dos efeitos atribuídos a esse peptídeo. Assim, a utilização de PAPP-A durante protocolos de PIVE, como estratégia para maximizar a indução do metabolismo lipídico em culturas que levam soro fetal bovino (SFB), quanto no papel antioxidativo em ambientes com altas concentrações de EROs, pode resultar em um aumento do sucesso obtido com o uso de biotécnicas *in vitro*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Testamos aqui se, a adição de PAPP-A (uma proteína que aumenta a biodisponibilidade de IGF-1) na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos potencializaria as ações mediadas pelo IGF-1. Investigamos dois aspectos importantes durante o desenvolvimento oocitário e embrionário em que o IGF-1 tem demonstrado participar: o metabolismo lipídico e o estresse oxidativo.

Na primeira abordagem, utilizamos um sistema onde a fonte de IGF-1 foi o soro fetal bovino (SFB), visto que em sistemas de PIVE convencionais este suplemento é amplamente utilizado, e dentre as diversas substâncias que o compõe, encontra-se também o IGF-1. Avaliamos o conteúdo lipídico dos oócitos e blastocistos, a taxa de produção embrionária e o perfil de transcritos dos blastocistos produzidos. Além disso, armazenamos amostras de oócitos e blastocistos para análise do perfil de lipídeos nessas amostras, no entanto, ainda não conseguimos realizar essas análises. A adição de PAPP-A na maturação *in vitro* (MIV) de complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos modulou transcritos nos blastocistos resultantes, reduzindo genes relacionados ao acúmulo lipídico, apoptose e, inesperadamente, genes marcadores da qualidade embrionária. No entanto, com o uso dessa estratégia o conteúdo lipídico dos oócitos ou dos embriões não foi alterado.

Acreditamos que, embora os blastocistos produzidos a partir dos CCOs maturados com adição de PAPP-A apresentem menor abundância relativa de RNAm de genes relacionados a síntese de lipídeos, a utilização de SFB no cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões pode ter mascarado o efeito do tratamento, já que os lipídeos presentes no ambiente podem ser incorporados pelos blastocistos. Além disso, não sabemos se o perfil lipídico dos oócitos e embriões foi alterado pela adição da PAPP-A.

Em um segundo momento, utilizamos tanto na MIV, quanto na CIV, a adição de uma substância estressora, a menadiona, para avaliar se a PAPP-A intensificaria a ação antioxidativa mediada pelo IGF-1. Nós avaliamos parâmetros funcionais, morfológicos e moleculares, como a progressão da meiose, o potencial de membrana mitocondrial, a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de glutatona (GSH) total, o perfil de transcritos, a taxa de blastocistos produzidos. Nós também coletamos os meios de MIV e CIV para análise das concentrações de IGF-1, no entanto, os resultados ainda não estão prontos. No geral, a combinação IGF-1/PAPP-A revelou os melhores resultados normalizando o potencial de membrana mitocondrial e, principalmente, apresentando as menores concentrações de EROs, tanto em oócitos, quanto em blastocistos, e ainda aumentando o número de embriões produzidos.

Estudos já haviam testado se o IGF-1 possuía papel antioxidante durante quando adicionado ao CIV, no entanto, em nenhum desses estudos sua administração exógena reduziu efetivamente as concentrações de EROs. A combinação IGF-1/PAPP-A no CIV reduziu a expressão de genes marcadores do estresse oxidativo e aumentou a expressão de enzimas antioxidantes, e essa modulação da abundância relativa de RNAm pode ter refletido na menor concentração de EROs nos blastocistos resultantes.

Nós observamos que a adição de IGF-1 ou a combinação IGF-1/PAPP-A na MIV alterou de forma discreta o perfil de transcritos nos blastocistos produzidos, no entanto um desses genes foi o *ELOVL-5*, que está envolvido no alongamento de cadeias lipídicas. Nesse momento, houve a diminuição desse transcrito nos blastocistos produzidos, o mesmo padrão encontrado na primeira abordagem de estudo que propusemos quando avaliamos o metabolismo lipídico, onde a adição de PAPP-A em meio MIV suplementado com SFB reduziu a expressão de genes relacionados ao

metabolismo lipídico. No entanto, quando a administração das proteínas (IGF-1/PAPP-A) aconteceu durante a CIV, os embriões produzidos apresentaram o padrão contrário, onde houve aumento na expressão gênica dos genes envolvidos no metabolismo lipídico. Assim, uma hipótese é que, a princípio, o IGF-1 induza a expressão pró-metabolismo lipídico e que, a posterior diminuição desses genes observada no embrião produzido ocorra, pois este embrião já adquiriu a competência de metabolizar lipídeos, não sendo necessária a alta expressão dessas enzimas. Dessa forma, o IGF-1 funcionaria com um modulador da homeostase do metabolismo lipídico. Mas tudo isso, é mera especulação.

Pensando nos resultados obtidos nas duas abordagens, acreditamos que a estratégia da adição do biodisponibilizador de IGF-1, a PAPP-A, com intuito de potencializar suas ações durante a PIVE de bovinos, foi eficaz em ambos os sistemas, porém os efeitos mais marcantes foram alcançados com a administração exógena de ambas as proteínas IGF-1/PAPP-A. Assim, acreditamos que os melhores resultados seriam alcançados com a adição de IGF-1/PAPP-A tanto na MIV quanto na CIV.

ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

Artigos completos publicados em periódicos

1. **FRANCHI, F.F.**; HERNANDES, M.P.; COALHO FERREIRA, A.L.; VIEIRA DE LIMA, V.A.; DE OLIVEIRA MENDES, L.; MUSA DE AQUINO, A.; SCARANO, W.R.; CÉSAR DE SOUZA CASTILHO, A. Fractal analysis and histomolecular phenotyping provides insights into extracellular matrix remodeling in the developing bovine fetal ovary. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020.
2. **FRANCHI, FERNANDA FAGALI**; SATRAPA, RAFAEL AUGUSTO ; FONTES, PATRÍCIA KUBO ; SANTOS, PRISCILA HELENA ; RAZZA, EDUARDO MONTANARI ; EMANUELLI, ISABELE PICADA ; ERENO, RONALDO LUIZ ; MARECO, EDSON ASSUNÇÃO ; NOGUEIRA, MARCELO FÁBIO GOUVEIA ; BARROS, CIRO MORAES ; SOUZA CASTILHO, ANTHONY CÉSAR. Equine chorionic gonadotropin drives the transcriptional profile of immature cumulus-oocyte complexes and in vitro-produced blastocysts of superstimulated Nelore cows. *Molecular Reproduction and Development*, v. 86, p. 1639, 2019.
3. GIROTO, ALAN B. ; FONTES, PATRÍCIA K. ; **FRANCHI, FERNANDA F.** ; DOS SANTOS, PRISCILA H. ; RAZZA, EDUARDO M. ; NOGUEIRA, MARCELO F. G. ; MAIOLI, MARCOS A. ; NOGUEIRA, GUILHERME P. ; NUNES, GIOVANA B. ; MINGOTI, GISELE Z. ; MARECO, EDSON A. ; CASTILHO, ANTHONY C. S. . Use of pregnancy-associated plasma protein-A during oocyte in vitro maturation increases IGF-1 and affects the transcriptional profile of cumulus cells and embryos from Nelore cows. *Molecular reproduction and development*, v. 86, p. 1694, 2019.
4. CASTILHO, A.C.S. ; DALANEZI, F.M. ; **FRANCHI, F. F.** ; PRICE, C.A. ; FERREIRA, J.C.P.; TREVISOL, E. ; BURATINI, J. Expression of fibroblast growth factor 22 (FGF22) and its receptor, FGFR1B, during development and regression of bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 125, p. 1-5, 2019.

5. MORALES DALANEZI, FELIPE; MOGOLLON GARCIA, HENRY DAVID ; DE ANDRADE FERRAZZA, RODRIGO; **FAGALI FRANCHI, FERNANDA**; KUBO FONTES, PATRICIA ; DE SOUZA CASTILHO, ANTHONY CESAR ; GOUVEIA NOGUEIRA, MARCELO FÁBIO ; DOS SANTOS SCHMIDT, ELIZABETH MOREIRA ; SARTORI, ROBERTO ; PINHEIRO FERREIRA, JOÃO CARLOS . Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. *Animal reproduction science*, v. 205, p. 94-104, 2019.
6. RAZZA, E.M. ; SUDANO, M. J. ; FONTES, P.K. ; **FRANCHI, F.F.** ; BELAZ, K. R. A. ; SANTOS, P.H. ; CASTILHO, A. C. S. ; ROCHA, D. F. ; MACHADO, M. F. ; NOGUEIRA, MARCELO FÁBIO GOUVEIA . Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus-oocyte complexes and blastocysts. *Reproduction fertility and development*, v. 31, p. xx, 2018.
7. SANTOS, P.H. ; SATRAPA, R.A. ; FONTES, P.K. ; **FRANCHI, F.F.** ; RAZZA, E.M. ; MANI, F. ; NOGUEIRA, M.F.G. ; BARROS, C.M. ; CASTILHO, A.C.S. . Effect of superstimulation on the expression of microRNAs and genes involved in steroidogenesis and ovulation in Nelore cows. *Theriogenology*, v. 110, p. 192-200, 2018.
8. SANTOS, P.H. ; FONTES, P.K. ; **FRANCHI, F.F.** ; NOGUEIRA, M.F.G. ; BELAZ, K.R.A. ; TATA, A. ; EBERLIN, M.N. ; SUDANO, M.J. ; BARROS, C.M. ; CASTILHO, A.C.S. . Lipid profiles of follicular fluid from cows submitted to ovarian superstimulation. *Theriogenology*, v. 94, p. 64-70, 2017.

Capítulo de livro publicado

1. Castilho, Anthony C.S. ; Fontes, Patrícia K. ; **Franchi, Fernanda F.** ; Santos, Priscila H. ; Razza, Eduardo M. RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM ON REPRODUCTIVE BIOLOGY. In: *Renin-Angiotensin System - Past, Present and Future*. 1ed.: InTech, 2017, p. 71-81.

Resumos publicados em anais

1. **FRANCHI, F. F.**; SANTOS, P. H. ; FONTES, P. K. ; RAZZA, E. M. ; MARECO, E. ; NOGUEIRA, M. F. G. ; CASTILHO, A. C. S. . Equine chorionic gonadotropin (eCG) impacts the transcriptional profile of genes involved with competence of cumulus-oocyte complexes and embryo quality in superstimulated Nelore cows. In: 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018, Foz do Iguaçu. Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018. v. 15. p. 1122.
2. PRONUNCIATE, M. ; PIOLTINE, E. M. ; GUILHERME, V. B. ; **FRANCHI, F. F.** ; FONTES, P. K. ; NOGUEIRA, M. F. G. . Transcripts abundance modulation by AREG and FSH treatments during the in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. In: 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018, Foz do Iguaçu. Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018. v. 15. p. 1067.
3. SANTOS, P. H. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; GIROTO, A. B. ; NUNES, S. G. ; GUILHERME, V. B. ; CASTILHO, A. C. S. . HSPA5 and in vitro embryo production: effect of addition of the protein during in vitro embryo culture in cattle. In: 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018, Foz do Iguaçu. Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018. v. 15. p. 1070.
4. GIROTO, A. B. ; AMORIS, J. V. ; **FRANCHI, F. F.** ; FONTES, P. K. ; SANTOS, P. H. ; MAIOLI, M. A. ; NOGUEIRA, G. P. ; NUNES, G. B. ; MINGOTI, G. Z. ; NOGUEIRA, M. F. G. ; CASTILHO, A. C. S. . Evidence that pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) plays a role in bovine in vitro-embryo production. In: 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018, Foz do Iguaçu. Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018. v. 15. p. 1123.
5. SANTOS, P. H. ; **FRANCHI, F. F.** ; MENDES, L. O. ; FONTES, P. K. ; PINHEIRO, V. G. ; CASTILHO, A. C. S. . Expression of bta-miR-222 in bovine

granulosa cells: effect of follicle deviation and regulation by FSH/insulin in vitro. In: XXXII Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2018, Florianópolis. Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, 2018. v. 15. p. 453.

6. GIROTO, A. B. ; FRANCHI, F. F. ; FONTES, P. K. ; MAIOLI, M. A. ; NOGUEIRA, G. P. ; NOGUEIRA, M.F.G. ; CASTILHO, A.C.S. . Evidence that Pregnancy-Associated Serum Protein A (PAPP-A) Plays Role on Bovine In Vitro Embryo Production. In: IETS, 2018, Bangkok. 44° Annual Conference of the International Embryo Technology Society, 2018. v. 30. p. 204.

7. PIOLTINE, E. M. ; SAWA, A. G. ; ALMEIDA JUNIOR, A. M. ; PRONUNCIATE, M. ; **FRANCHI, F. F.** ; NOGUEIRA, M. F. G. . Gene expression related to meiosis resumption after associated use of NPPC and rhFSH during in vitro prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes. In: 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018, Foz do iguaçu. Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium, 2018. v. 15. p. 1059.

8. **F. F. FRANCHI**, P. K. FONTES, P. H. SANTOS, E. M. RAZZA, R. B. RODRIGUES, A. CARVALHO, M. F. G. NOGUEIRA, A. C. S. CASTILHO. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) added during in vitro maturation: effects on meiosis progression, oocyte DNA fragmentation and gene expression in bovine *cumulus*-oocyte complexes. In: XXXI Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017, Cabo de Santo Agostinho – PE. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017. v. 14. p. 830.

9. P. H. SANTOS, P. K. FONTES, **F. F. FRANCHI**, V. B. GUILHERME, M. F. G. NOGUEIRA, C. M. BARROS, A. C. S. CASTILHO. Changes in MicroRNAs expression in granulosa cells from superstimulated cows. In: XXXI Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017, Cabo de Santo Agostinho – PE. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017. v. 14. p.786.

A. B. Giroto, P. K. FONTES, **F. F. FRANCHI**, E. M. RAZZA, M. Maioli, G. P. Nogueira, M. F. G. NOGUEIRA, A. C. S. CASTILHO. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) increases free IGF-1 on *in vitro* maturation medium and modulates important genes related to embryonic development in bovine *in vitro*-produced blastocysts. In: XXXI Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017, Cabo de Santo Agostinho – PE. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017. v. 14. p. 831.

10. **FRANCHI, F. F.**; FONTES, P. K. ; SANTOS, P. H. ; LOUREIRO, B. ; SILVEIRA, J. C. ; NOGUEIRA, M. F. G. ; BARROS, C. M. ; CASTILHO, A. C. S. . The addition of exosomes from superstimulated Nelore cows during *in vitro* oocyte maturation modulates embryo gene expression. In: 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2016, Tours - França. Abstract Book, 2016. p. 415-415.

11. SANTOS, P. H. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; NOGUEIRA, M. F. G. ; BARROS, C. M. ; SUDANO, M. J. ; BELAZ, K. R. A. ; TATA, A. ; EBERLIN, M. N. ; CASTILHO, A. C. S. . Effects of ovarian superstimulation on follicular microenvironment: profile of phospholipids in follicular fluid and regulation of CPT1B mRNA abundance in granulosa cells from Nelore cows. In: 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2016, Tours - França. Abstract Book, 2016. p. 26-26

12. DALANEZI, F. M. ; GARCIA, H. D. M. ; FERRAZZA, R. A. ; ARISTIZABAL, V. H. V. ; DESTRO, F. C. ; CUERVO, J. C. O. ; SARTORI FILHO, R. ; JUNIOR, L. R. P. A. ; **FRANCHI, F. F.** ; FONTES, P. K. ; CASTILHO, A. C. S. ; SILVA, L. F. M. C. ; NUNES, S. ; ARAUJO, E. A. B. ; PINTO, B. M. ; HAYASHI, R. M. ; FERREIRA, J. C. P. Modulation of genes related to the expansion of the cumulus cells by the use of oocyte maturation medium supplemented with bovine extracellular vesicles under heat stress. In: 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2016, Tours - França. Abstract Book, 2016. p. 255-256.

13. SANTOS, P. H. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; NOGUEIRA, M. F. G. ; BARROS, C. M. ; SUDANO, M. J. ; CASTILHO, A. C. S. Perfil de genes relacionados

ao metabolismo lipídico em células da granulosa de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, Foz do Iguaçu – PR. Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016. Anais da Reunião Anual, 2016. p.271.

14. **FRANCHI, F. F.**; FONTES, P. K. ; SANTOS, P. H. ; RAZZA, E. M. ; LOUREIRO, B. ; SILVEIRA, J. C. ; NOGUEIRA, M. F. G. ; BARROS, C. M. ; CASTILHO, A. C. S. . Exossomos do fluido folicular de vacas Nelore modulam a expressão gênica em células do *cumulus* e blastocistos bovinos. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, Foz do Iguaçu – PR. Anais da Reunião Anual, 2016. p. 272-273.

15. RAZZA, E. M. ; SUDANO, M. J. ; BELAZ, K. R. A. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; SANTOS, P. H. ; EBERLIN, M. N. ; MACHADO, M. F. ; NOGUEIRA, M. F. G. . Pré-maturação oocitária de duas horas com forskolin e IBMX modula os perfis lipídico e de expressão gênica em blastocistos bovinos produzidos in vitro. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, Foz do Iguaçu – PR. Anais da Reunião Anual, 2016. p. 315-316.

16. SANTOS, P. H. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; RAZZA, E. M. ; NOGUEIRA, M. F. G. ; AMBROZIO-NETO, C. ; BARROS, C. M. ; CASTILHO, A. C. S. . Expression and regulation of bta-mir222 in bovine antral follicles. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR), 2016, Campos do Jordão – SP. Animal Reproduction, 2016. v. 14, p. 262.

17. RAZZA, E. M. ; SUDANO, M. J. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; SANTOS, P. H. ; VILELA, J. ; MACHADO, M. F. ; NOGUEIRA, M. F. G. Bovine oocyte prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators: in vitro performance and semi-quantitative lipid evaluation. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR), 2016, Campos do Jordão – SP. Animal Reproduction, 2016. v. 14, p. 242.

18. FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; RODRIGUES, R. B. ; CARVALHO, A. ; SANTOS, P. H. ; RAZZA, E. M. ; NOGUEIRA, M. F. G. ; CASTILHO, A. C. S. . Pregnancy associated plasma protein-a improves oocyte maturation and modulates transcription pattern in bovine in vitro-produced embryos. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR), 2016, Campos do Jordão – SP. Animal Reproduction, 2016. v. 14, p. 277.

Apresentação de trabalho

1. RAYANE ISABELLE TURKÓCIO; **FERNANDA FAGALI FRANCHI**; EDUARDO MONTANARI RAZZA; ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO; PATRÍCIA KUBO FONTES. Toxic effect of a-l-fucosidase added during *in vitro* fertilization of bovine embryos.

2. **3º lugar** entre os trabalhos apresentados na forma de pôster ao XIX Congresso Farmacêutico de São Paulo e XI Seminário Internacional de Ciências Farmacêuticas e Expofar 2017 - 06 a 08 de outubro de 2017, Centro de Convenções Frei Caneca – São Paulo – SP.

3. RODRIGUES, R. B. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; CARVALHO, A. ; SANTOS, P. H. ; RAZZA, E. M. ; SOARES, A. C. S. . Efeito da adição da proteína sérica A associada à prenhez (PAPP-A) sobre os aspectos celulares da maturação *in vitro* de oócitos bovinos, 2016.

4. CARVALHO, A. ; FONTES, P. K. ; **FRANCHI, F. F.** ; RODRIGUES, R. B. ; SANTOS, P. H. ; RAZZA, E. M. ; CASTILHO, A. C. S. . Efeito da adição da proteína sérica A associada à prenhez (PAPP-A) durante a maturação *in vitro* na produção de embriões bovinos, 2016.

Participação em banca examinadora

1. Trabalho de conclusão de curso Victor Augusto Vieira de Lima: “Impacto da adição da proteína sérica- a associada à prenhez (PAPP-A) durante a maturação oocitária *in vitro* sobre a produção e o conteúdo lipídico de embriões bovinos”; Curso de veterinária, UNOESTE – Presidente Prudente, 31 de outubro de 2019.

2. Trabalho de conclusão de curso Raquiel Bueno Rodrigues: “Efeito da adição da proteína sérica a associada à prenhez (PAPP-A) sobre aspectos celulares e moleculares da maturação *in vitro* de oócitos bovinos”; Curso de biomedicina, UNIP – Campus Bauru, 04 de agosto de 2017.
3. Trabalho de conclusão de curso de Andressa Carvalho: “Efeito da adição da proteína sérica a associada à prenhez (PAPP-A) durante a maturação *in vitro* sobre a produção de embriões bovinos”; Curso de Biomedicina, UNIP – Campus Bauru, 04 de agosto de 2017.

Organização de eventos

1. Membro da comissão organizadora do IX Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC), 12 e 13 de março de 2020, Botucatu – SP.
2. Membro da comissão organizadora do VIII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC), 14 e 15 de março de 2019, Botucatu – SP.
3. Staff no 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018), 16 a 20 de setembro de 2018, Foz do Iguaçu – PR.
4. Organização do II Curso de inverno da Farmacologia e Biotecnologia da UNESP de Botucatu, 02 a 06 de julho de 2018, Botucatu – SP.
5. Organização do 1º Workshop FARMABIOTEC: *in vitro* embryo production, realizado no dia 10 de maio de 2018, UNESP – Botucatu – SP.
6. Membro da comissão organizadora do VII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC), 05 e 06 de março de 2018, Botucatu – SP.
7. Staff na XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), 17 a 19 de agosto de 2017, Cabo de Santo Agostinho – PE.

Palestras e workshops ministrados

1. Workshop de “BIOTÉCNICAS APLICADAS A REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA”, promovido pelo curso de Biomedicina da Universidade Paulista (UNIP), campus Bauru, 07 e 14 de maio de 2018, Bauru – SP.
2. Palestra intitulada: “OVOGÊNESE E MATURAÇÃO OOCITÁRIA”, 06 de outubro de 2017, UNOESTE, Presidente Prudente-SP.
3. Palestra intitulada: “O SEXO BIOLÓGICO”, na mesa redonda: “Precisamos falar sobre Gênero e Sexualidade” na XXIV Semana da Biologia de Bauru, 24 – 28 de abril de 2017, Bauru – SP.
4. Palestra intitulada: “VESÍCULAS EXTRACELULARES EM FLUIDO FOLICULAR DE VACAS SUPERESTIMULADAS E SEUS EFEITOS SOBRE A PIVE” em Workshop GIFT: Como fazer um blastocisto? 10 a 11 de abril de 2017; Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu – SP
5. Workshop de “INTRODUÇÃO A TÉCNICA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES”, promovido pelo curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista (UNIP), campus Bauru, 29 de agosto de 2017, Bauru – SP.
6. Workshop de “REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA”, promovido pelo curso de Biomedicina da Universidade Paulista (UNIP), campus Bauru, 15 e 22 de maio de 2017, Bauru – SP.

Participação em eventos

1. VIII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC), 14 e 15 de março de 2019, Botucatu – SP.
2. 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018), 16 a 20 de setembro de 2018, Foz do Iguaçu – PR.
3. 1º Workshop FARMABIOTEC: *in vitro* embryo production, realizado no dia 10 de maio de 2018, UNESP – Botucatu – SP.

4. VII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC), 05 e 06 de março de 2018, Botucatu – SP.
5. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), 17 a 19 de agosto de 2017, Cabo de Santo Agostinho – PE.
6. VI Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP (SIMFARTEC), 9 e 10 de março de 2017, Botucatu – SP.
7. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), 25 a 27 de agosto de 2016, Foz do Iguaçu – PR.

Representação discente

1. Representante discente (Titular) junto ao PPG em Farmacologia e Biotecnologia; Março/2018 – Março/2019.
2. Representante discente (Suplente) junto ao PPG em Farmacologia e Biotecnologia; Março/2019 – Março/2020.