

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE NEURORREGULINA 1 NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E
EMBRIONÁRIO EM BOVINOS**

Thaisy Tino Dellaqua

Botucatu – SP

2021

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE NEURORREGULINA 1 NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E
EMBRIONÁRIO EM BOVINOS**

Thaisy Tino Dellaqua

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-Unesp, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini

Coorientador: Prof. Dr. Alberto Maria Luciano

Botucatu – SP

2021

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

Dellaqua, Thaisy Tino.

Efeitos da adição de neurorregulina 1 no meio de maturação *in vitro* sobre o desenvolvimento oocitário e embrionário em bovinos / Thaisy Tino Dellaqua. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Buratini

Coorientador: Alberto Maria Luciano

Capes: 50504002

1. Bovinos - Reprodução. 2. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 3. Transferência de embriões. 4. Neurregulinas.

Palavras-chave: ERK1/2; Maturação nuclear; NRG1; PIV; PKC.

THAISY TINO DELLAQUA

Efeitos da adição de neurorregulina 1 no meio de maturação *in vitro* sobre o desenvolvimento oocitário e embrionário em bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Buratini

Presidente e orientador

Departamento de Biologia Funcional e Estrutural – IB/UNESP Botucatu

Profa. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes

Membro titular

Departamento de Ciências Biológicas – UNIFESP Diadema

Profa. Dra. Fernanda Landim

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP Botucatu

Botucatu – SP

2021

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Maurício Sérgio (in memoriam) e Margarete.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me abençoado durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final.

De forma especial, ao meu pai Maurício Sérgio (*in memoriam*) e à minha mãe Margarete, por serem meu porto seguro e inspiração, além de todo apoio e amor incondicional. Ao meu irmão João Victor, que aconselha e apoia minhas decisões. Aos meus avós maternos e paternos, dos quais me orgulho muito.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Buratini, pela oportunidade, confiança atribuída e todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos que contribuíram para meu crescimento profissional, pessoal e intelectual. Meu eterno agradecimento e admiração!

Ao coorientador Prof. Dr. Alberto Maria Luciano e à Prof. Dra. Valentina Lodde, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Às parcerias, em especial aos amigos Ludimila Janini e Edjalma Rodrigues, pela prontidão e disposição com os experimentos. Ao Prof. Dr. Anthony Castilho e seu grupo de pesquisa, sobretudo Fernanda Franchi e Sarah Nunes, pela colaboração e aprendizado.

Aos amigos: Ana Caroline Soares, por todo aprendizado, conselhos e amizade; Renan Vígaro, por todo apoio, carinho e mão amiga nos experimentos; Evelyn Fernanda Flores e Isabella Feltrin, por dividirem as angústias e vitórias comigo; Vinícius Rodrigues e Maycon Tavares, por trazerem alegria aos meus dias; Mariângela Bueno e Adriano Mendes, por todo carinho e amizade; Fernanda Oliveira e Daniel Carvalho, por toda amizade, companhia e apoio; Maiara Basaglia, pelos momentos de alegria e diversão. Novamente à Evelyn, pela amizade, carinho e apoio durante a pandemia e por compartilhar momentos importantes comigo.

Aos proprietários e funcionários dos Frigoríficos Frigonobre em Torrinha – SP e Fribordogue em Bariri – SP, pelo apoio à pesquisa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia, pelo apoio diário e dedicação ao trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e por enriquecerem este trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP, pelo suporte financeiro para realização deste trabalho (2019/14588-6).

Por fim, agradeço carinhosamente todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos apresenta impacto positivo sobre melhoramento genético, produtividade e lucratividade da pecuária, embora sua eficiência seja reconhecidamente baixa. A maturação oocitária *in vitro* (MIV) é considerada o principal gargalo tecnológico da PIV. Os protocolos vigentes para MIV não refletem a fisiologia e determinam descompasso entre a maturação nuclear e citoplasmática do oócito, o que desperta interesse no desenvolvimento de abordagens para melhorar as taxas de maturação e fertilização. A neurorregulina 1 (NRG1), um fator EGF-like específico que modula as vias induzidas por EGFR, principalmente ampirregulina (AREG), ajustou a retomada da meiose e melhorou a taxa de fertilização em camundongos. O objetivo central deste estudo foi investigar os efeitos da adição de NRG1 durante a MIV sobre a progressão meiótica e desenvolvimento embrionário em bovinos, associada a uma estratégia de MIV induzida com AREG. A NRG1 atrasou a quebra da vesícula germinativa e melhorou o desenvolvimento embrionário, aumentando a produção de embriões transferíveis e o número total de células dos blastocistos. O presente estudo mostrou, pela primeira vez, a atividade da NRG1 durante a maturação de oócitos bovinos, capaz de beneficiar a competência oocitária e, conseqüentemente, a PIV.

Palavras-chave: NRG1, maturação nuclear, PIV, ERK1/2, PKC.

ABSTRACT

In vitro production (IVP) of bovine embryos has been a positive impact on productivity and profitability in beef and dairy cattle despite its recognized low efficiency. *In vitro* maturation (IVM) is considered to be the main technical bottleneck of IVP. Current IVM protocols do not reflect the physiology and determine desynchronization between nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, which arouses interest in the development of approaches to improve the maturation and fertilization rates. Neuregulin 1 (NRG1), a specific EGF-like factor that modulates the EGFR-induced pathways, mainly amphiregulin (AREG), adjusted the meiosis resumption and improved the fertilization rate in mice. The goal of this study was to investigate the effects of the NRG1 addition during IVM on meiotic progression and embryo development in cattle, associated with an IVM strategy induced with AREG. NRG1 delayed the germinal vesicle breakdown and improved embryo development, increasing the production of transferable embryos and total embryonic cell number. The present study showed, for the first time, the activity of NRG1 during the oocyte maturation of bovine, able to benefit oocyte competence and, consequently, IVP.

Keywords: NRG1, nuclear maturation, IVP, ERK1/2, PKC.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMs = família das desintegrinas e metaloproteinases
AMPc = monofosfato cíclico de adenosina
AREG = ampirregulina
ATP = adenosina tri-fosfato
BMP15 = proteína morfogênica óssea 15
BSA = albumina sérica bovina
BTC = betacelulina
CC = células do *cumulus*
CIV = cultivo *in vitro*
COC = complexo *cumulus*-oócito
CO₂ = dióxido de carbono
COX 2 = ciclooxigenase 2
Cx-37 = conexina 37
Cx-43 = conexina 43
DEG = degenerado
EGF = fator de crescimento epidermal
EGF-like = fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal
EGFR/ErbB1 = receptor de EGF
EPGN = mitogênio epitelial
ErbB2-4/HER2-4 = receptor de EGF-like
EREG = epirregulina
ERK = quinases reguladas por sinais extracelulares
ERK1/2 = quinases reguladas por sinais extracelulares do tipo 1 e 2
FGF = fator de crescimento de fibroblastos
FIV = fecundação *in vitro*
FSH = hormônio folículo estimulante
GDF9 = fator de crescimento e diferenciação 9
GJ = junções comunicantes do tipo gap
GMPc = monofosfato cíclico de guanosina
GRP3 = receptores acoplados à proteína G do tipo 3
GV = vesícula germinativa
GVBD = quebra da vesícula germinativa
HA = ácido hialurônico

HAS2 = hialurona sintase 2

HB-EGF = fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina

IGF-1 = fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

LH = hormônio luteinizante

LHR = receptor de LH

MAPK = proteína quinase ativada por mitógenos

MGC = células da granulosa mural

MI = metáfase I

MII = metáfase II

MIV = maturação *in vitro*

MPF = fator promotor da maturação

mtDNA = ácido desoxirribonucleico mitocondrial

mRNA = ácido ribonucleico mensageiro

N₂ = nitrogênio

NaCl = cloreto de sódio

NPPC = peptídeo natriurético tipo C

NPR2 = receptor peptídeo natriurético tipo 2

NRG1-4 = neuroregulina 1-4

O₂ = oxigênio

OSF = fatores secretados pelo oócito

PBS = tampão fosfato-salina

PDE3A = fosfodiesterase do tipo 3A

PG = prostaglandinas

PGE2 = prostaglandina E2

PIV = produção *in vitro* de embriões

PKA = proteína quinase A

PKC = proteína quinase C

PTGS2 = prostaglandina sintetase 2

PTX3 = pentraxina 3

RNA = ácido ribonucleico

SF = sistema folicular

TGF α = fator de crescimento transformador- α

TNFAIP6 = fator de necrose tumoral 6

TZP = projeções transzonais

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Representação esquemática da coordenação de GMPc e AMPc no controle da parada meiótica. A estimulação do receptor peptídico natriurético tipo 2 (NPR2) induzida pelo peptídeo natriurético tipo C (NPPC) nas células da granulosa mural e do *cumulus* aumenta as concentrações intracelulares de GMPc em ambas as células. A manutenção da funcionalidade das junções gap permite a passagem do GMPc até o oócito, impedindo que a fosfodiesterase do tipo 3A (PDE3A) hidrolise o AMPc em 5'AMP, o que mantém os níveis de AMPc suficientes para inibir a quebra de vesícula germinativa (GVBD).....Pg. 19

Figura 2 - Representação esquemática do controle da retomada meiótica. *In vivo*, o pico de LH ativa o seu receptor (LHR) e provoca desfosforilação e inativação de NPR2, o que diminui a produção de GMPc nas células da granulosa mural (MGC). Essa ligação, na presença de altos níveis de AMPc, também ativa a cascata p38MAPK e induz a expressão de EGF-like [ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC)]. Após ativação, os EGF-like se ligam aos seus receptores (EGFR) presentes tanto nas MGCs quanto nas células do *cumulus* (CCs) e promovem a autofosforilação dos mesmos, o que permite a ativação da via ERK1/2. Esta via induz a liberação de prostaglandina E2 (PGE2) e ativação de p38MAPK, amplificando a expressão dos EGF-like nas MGCs e CCs, além disso, ERK1/2 auxilia na fosforilação das conexinas (Cx-43 e Cx-37) que induz o fechamento das junções gap responsáveis por regular o transporte de GMPc e AMPc entre as células, comprometendo a ação inibitória de GMPc sobre a PDE3A no oócito. AMPc também é sintetizado de maneira autônoma no oócito por receptores acoplados à proteína G constitutivamente ativo (GPR3). A PDE3A hidrolisa AMPc em 5'-AMP, prejudicando a atividade da PKA e consequente ativação do MPF, que fosforila proteínas que circundam o envelope nuclear, resultando na quebra da vesícula germinativa (GVBD) e retomada da meiose. O oócito secreta fatores BMP15 e GDF9 que ativam a via SMAD2/3 após se ligarem aos seus receptores nas CCs. Esta via regula a biossíntese de esteroides, luteinização e metabolismo energético da célula, além de induzir a expressão de genes relacionados com a expansão do *cumulus* [hialurona sintase 2 (HAS2), fator de necrose tumoral 6 (TNFAIP6 ou TSG6) e pentraxina 3 (PTX3)]. A sinalização EGFR também está envolvida na expressão destes genes e expansão do *cumulus*. *In vitro*, o FSH ativa seu receptor (FSHR) e estimula a expressão de EGF-like via p38MAPK e consequente ativação de fatores que promovem a retomada da meiose..... Pg. 21

Figura 3 – Representação esquemática dos papéis de EGFR e NRG1 durante a maturação oocitária. O pico pré-ovulatório de LH induz a expressão de fatores EGF-like [ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e neurorregulina 1 (NRG1)] em células da granulosa mural (MGC). AREG e EREG atuam no receptor EGFR, expressos tanto nas MGCs quanto nas células do *cumulus* (CC), para estimular a via ERK1/2 e a PKC. Ambas as vias ativam

expressões gênicas envolvidas no processo de ovulação, no entanto, a ativação irregular de PKC acelera a progressão meiótica do oócito devido ao fechamento precoce das junções gap entre as CCs e o oócito. NRG1 atua no receptor ErbB3, presente nas MGCs e CCs, e diminui a atividade de PKC para um nível fisiológico, o que retarda a retomada meiótica e ajusta o tempo de maturação oocitária ao tempo de ovulação.....Pg. 27

Capítulo II

Fig. 1. Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on meiosis progression. COCs were subjected to IVM with FS medium in presence of 0, 1, 10 or 100 ng/mL NRG1 **a)** for 6 hours ($P \leq 0.05$). GVBD: germinal vesicle breakdown. **b)** for 9, 12, 20 or 24 hours ($P > 0.05$). MI: metaphase I; MII: metaphase II. Data are represented by mean $\pm$ S.E.M. of five biological replicates with 124, 134, 119, and 122 at 6h; 121, 123, 120, and 118 at 9h; 160, 151, 160, and 159 at 12h; 115, 129, 124, 125 at 20h; 162, 133, 142, and 146 at 24h of COCs in the 0, 1, 10, and 100 ng/mL NRG1 groups respectively.....Pg. 41

Fig. 2. Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on *cumulus* expansion. COCs were matured with FS medium in presence of 0, 1, 10 or 100 ng/mL NRG1. **a)** Panels show representative images of groups after 24 hours of IVM **b)** Percentage of COCs with complete or nearly complete expansion was calculated in relation to total oocytes ($P > 0.05$). Data are represented by mean $\pm$ S.E.M. of five biological replicates with 157, 151, 153, and 158 COCs in the 0, 1, 10, and 100 ng/mL NRG1 groups respectively.....Pg. 42

Fig. 3. Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on embryo production. COCs matured with FS medium in presence of 1 ng/mL NRG1 or not **a)** Blastocyst production rate ($P > 0.05$). **b)** Expanded and hatched blastocysts rate was calculated in relation to total blastocysts ($P \leq 0.05$). **c)** Expanded and hatched blastocysts rate was calculated in relation to total oocytes ($P \leq 0.05$). Data are represented by mean $\pm$ S.E.M. of five biological replicates with 179 and 168 COCs in the FS and FS + NRG1 groups respectively.....Pg. 43

Fig. 4. Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on embryo quality. COCs were matured with FS medium in presence of 1 ng/mL NRG1 or not. **a)** Panels show representative images of each blastocyst evaluated after staining with 1 μ g/mL Hoechst 33342. Magnification $\times 400$ **b)** Total blastocyst cell number was counted under a fluorescence microscope ($P \leq 0.05$). Data are represented by mean $\pm$ S.E.M. of five biological replicates with 55 and 60 embryos in the FS and FS + NRG1 groups respectively.....Pg. 44

SUMÁRIO

Capítulo I.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Fisiologia da maturação oocitária.....	17
2.2. Controle da retomada da meiose	18
2.3. Controle da expansão das células do <i>cumulus</i>	22
2.4. Interação <i>cumulus</i> -oócito.....	24
2.5. Neurorregulina 1 (NRG1)	25
3. HIPÓTESE	28
4. OBJETIVO GERAL.....	28
Capítulo II	29
ABSTRACT.....	32
1. INTRODUCTION.....	33
2. MATERIAL AND METHODS	34
3. RESULTS	37
4. DISCUSSION AND CONCLUSION	37
FIGURES.....	41
REFERENCES.....	44
Considerações Finais	48
Referências	50

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma técnica que apresenta impacto positivo sobre melhoramento genético, produtividade e lucratividade da pecuária, sendo empregada de forma crescente em todo o mundo. O Brasil assumiu uma posição de vanguarda na adoção da PIV em bovinos, tornando-se uma referência mundial desta técnica, entretanto, em 2017 os EUA retomaram a liderança na produção total de embriões produzidos *in vitro* (Viana, 2020). O perfil da PIV no Brasil reflete a aproximação entre os custos da tecnologia e os ganhos proporcionados por sua aplicação. Apesar de sua viabilidade comercial, a PIV possui baixa eficiência, uma vez que oócitos maturados *in vitro* apresentam menor fertilidade do que aqueles maturados *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002). Além disso, os sistemas de cultivo não reproduzem em laboratório o ambiente *in vivo*, o que resulta em descompasso entre a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos e alterações epigenéticas nos embriões (Sirard *et al.*, 2006). Desse modo, o aprimoramento dos sistemas de PIV pode gerar o aumento das taxas de produção e qualidade embrionária, o que proporcionaria ganhos substanciais à pecuária.

Em oócitos de mamíferos, a meiose é bloqueada no diplóteno da prófase I, fase conhecida como vesícula germinativa (GV), até a ovulação ou atresia. Após a retomada da meiose induzida pelo pico pré-ovulatório de LH, a maturação nuclear progride até a metáfase II (MII), quando é interrompida novamente para ser retomada somente após a fecundação (Pincus and Enzmann, 1935). O LH induz a expressão de ampirregulina (AREG) e epirregulina (EREG), conhecidas como fatores EGF-like, nas células das granulosa murais, por meio dos níveis elevados de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e ativação da via p38MAPK. Em seguida, a AREG e a EREG estimulam a sua própria produção nas células do *cumulus* (CCs). Já na maturação *in vitro* (MIV), o hormônio folículo estimulante (FSH) é usualmente utilizado como indutor da maturação, estimulando a expressão e produção de AREG e EREG diretamente nas CCs (Freimann *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2013a).

Os fatores EGF-like são sintetizados como precursores transmembrânicos e devem ser clivados pelos membros da família das desintegrinas e metaloproteínases (ADAMs) para serem liberados da superfície celular em sua forma ativa (Ben-Ami *et al.*, 2006). Uma vez liberados, esses fatores se ligam com diferentes especificidades a quatro receptores da família EGFR nas CCs, também conhecidos como ErbB ou HER (Conti *et*

33 *al.*, 2006). A ligação dos EGF-like aos seus receptores provoca a autofosforilação, o que
34 promove a ativação de vias de sinalização subsequentes e diferentes respostas, como
35 regulação da expressão gênica, proliferação celular e ativação das MAPK/ERKs e
36 PI3K/AKT (Carpenter and Cohen, 1990; Harris *et al.*, 2003; Conti *et al.*, 2006; Zeng and
37 Harris, 2014), vias presentes na cascata ovulatória (Gilchrist *et al.*, 2008), que estimulam
38 a retomada da meiose e a expansão das CCs (Freimann *et al.*, 2004).

39 Ao contrário dos demais membros da família EGF-like, a neurorregulina 1 (NRG1)
40 modula a retomada da meiose por meio da regulação das cascatas intracelulares ativadas
41 pelos demais fatores EGF-like, principalmente a AREG (Falls, 2003; Noma *et al.*, 2011;
42 Shimada and Yamashita, 2011). Em geral, os fatores EGF-like aumentam a atividade das
43 vias ERK1/2 e PKC nas CCs (Falls, 2003; Noma *et al.*, 2011; Shimada and Yamashita,
44 2011). Entretanto, a NRG1 diminui a atividade da PKC a um nível fisiológico por meio
45 da redução dos níveis de cálcio intracelular, o que retarda a retomada meiótica e ajusta a
46 maturação oocitária ao tempo de ovulação (Shimada *et al.*, 2016). A via PKC atua
47 diretamente na fosforilação das conexinas presentes nas junções gap entre as CCs e o
48 oócito, causando seu fechamento precoce. Assim, ao regular a ativação dessa via, a NRG1
49 atrasa a retomada meiótica (Lampe *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2016).

50 Estudos anteriores mostraram que a NRG1 desempenha um papel importante durante
51 o processo de maturação dos complexos cumulus-oócito (COCs) em camundongos
52 (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014) e suínos (Mao *et al.*, 2012). Noma *et al.*
53 (2011) avaliaram o efeito sinérgico da NRG1 tipo III com AREG durante a MIV de COCs
54 de camundongos e demonstraram que NRG1 atua na ativação da AREG e juntas
55 aumentaram a atividade de ERK1/2 e a competência oocitária, regulando as alterações
56 temporais necessárias para a retomada meiótica e a competência oocitária. Além disso,
57 camundongos *knockout* para o gene *NRG1* nas GCs apresentaram retomada meiótica e
58 progressão para MII mais rápidas do que observadas em animais selvagens, além da
59 redução a atividade de ERK1/2, o que comprometeu a fertilização dos oócitos maduros e
60 a competência do desenvolvimento (Kawashima *et al.*, 2014). Já em porcos, Mao *et al.*
61 (2012) observaram que a adição de NRG1 no meio MIV estimulou a replicação de DNA
62 mitocondrial, melhorando a viabilidade do oócito e a formação do blastocisto. Estes
63 relatos mostram que a NRG1 desenvolve um papel importante durante o processo de
64 maturação dos COCs, porém, ainda não foi investigado seu efeito na MIV de COCs
65 bovinos.

Recentemente, nosso laboratório em colaboração com o Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão - Itália, desenvolveu um sistema para MIV com duas fases de cultivo denominado de Sistema Folicular (SF). O intuito deste sistema é expor inicialmente o COC a um ambiente semelhante ao encontrado no folículo pré-ovulatório, capaz de promover melhor sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática do oócito, bem como diferenciação mais fisiológica das CCs e comunicação prolongada entre elas e o oócito (fase Pré-MIV). Na segunda fase do cultivo (fase MIV), o SF objetiva induzir a maturação final do COC pela ativação da cascata ovulatória nas CCs com agentes fisiológicos, incluindo AREG, IGF-1, baixa concentração de FSH e hormônios esteróides. Em nossos estudos iniciais utilizando oócitos provenientes de abatedouro, observamos que a fase inicial de cultivo do SF retarda a quebra da GV sem comprometer a capacidade de concluir a MII, enquanto aumenta a comunicação entre as CCs e o oócito (Soares *et al.*, 2017).

Diante disto, o efeito da adição de NRG1 ao meio de maturação oocitária pode ser fundamental para melhorar os processos que fazem parte da PIV. A NRG1 adicionada ao meio MIV do SF, pode ser capaz de modular a cascata ovulatória causando uma melhoria na qualidade oocitária, número de embriões produzidos e qualidade embrionária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia da maturação oocitária

A maturação oocitária é um evento fisiológico que precede e é necessário para uma fertilização bem sucedida e posterior desenvolvimento embrionário (Lonergan and Fair, 2016), envolvida por mecanismos de maturação nuclear e citoplasmática (Ferreira *et al.*, 2009). A maturação nuclear é caracterizada pela progressão da meiose no oócito, que inclui diversos eventos como remodelagem da cromatina, quebra da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico e, após a fertilização, a extrusão do segundo corpúsculo polar, o que finaliza a meiose (Meinecke *et al.*, 2001). A maturação citoplasmática compreende mudanças estruturais e moleculares que ocorrem no oócito, incluindo a reorganização de organelas, acúmulo de proteínas, processamento de mRNA e produção de ATP (Watson, 2007; Landim-Alvarenga and Maziero, 2014).

Danos causados pelo descompasso entre a maturação nuclear e citoplasmática foram relatados há mais de 30 anos (Xu and Greve, 1988) e a busca por maior sincronia entre esses eventos são de suma importância para garantir o sucesso da fertilização. Em mamíferos, as células germinativas femininas entram nos estágios iniciais da meiose durante a vida fetal e são bloqueados no estágio de diplóteno da prófase I (conhecido como estágio de vesícula germinativa, GV) até que sejam comprometidos com a ovulação ou atresia. Durante a fase de GV, a condensação da cromatina ocorre gradualmente e pode ser classificada em quatro estágios (GV0, GV1, GV2 e GV3) até a GVBD, em contrapartida, a atividade transcricional do oócito diminui (Lodde *et al.*, 2007; Luciano *et al.*, 2014), uma vez que as junções do tipo gap (GJ – “gap junctions”) se fecham progressivamente (Luciano *et al.*, 2011), interferindo no transporte de fatores reguladores e metabólitos que afetam a progressão meiótica e a maturação citoplasmática.

A retomada da meiose é induzida *in vivo* pelo pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) e a maturação nuclear progride até o estágio de metáfase II (MII), quando é interrompida novamente para ser retomada somente após a fecundação (Pincus and Enzmann, 1935). Desta forma, quando o oócito é retirado do ambiente folicular antes do pico pré-ovulatório de LH, ocorre o descompasso entre a maturação citoplasmática e a nuclear, o que influencia negativamente a competência oocitária (Sirard, 2001).

2.2. Controle da retomada da meiose

Sabe-se que o ambiente folicular é responsável pela parada meiótica do oócito e que a remoção do complexo *cumulus*-oócito (COC) deste ambiente promove a maturação nuclear espontânea, uma vez que a influência de inibidores meióticos das células foliculares e do fluído folicular é interrompida (Pincus and Enzmann, 1935; revisado por Gilchrist, 2011). Em mamíferos, os nucleotídeos cíclicos são importantes para o controle deste processo, pois o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) em altas concentrações mantêm a parada meiótica (Gilchrist *et al.*, 2016). O AMPC é sintetizado de maneira autônoma no oócito por receptores acoplados à proteína G constitutivamente ativo (GPR3, Hinckley *et al.*, 2005; Mehlmann, 2005; Conti and Franciosi, 2018) e também é fornecido ao oócito pelas células da granulosa mural (MGCs) e células do *cumulus* (CCs) adjacentes, mediado pelas GJ (Anderson and

Albertini, 1976). Já o GMPc é produzido pelas MGCs e CCs após ativação do receptor peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2) induzida pelo ligante peptídeo natriurético tipo C (NPPC), sendo este sintetizado principalmente pelas MGCs (Vaccari *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2011; Shuhaibar *et al.*, 2016). O NPPC é um inibidor fisiológico da retomada da meiose e sustenta a funcionalidade das GJ (Franciosi *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2017), permitindo a passagem do GMPc entre as células e, este por sua vez, inibe a atividade da fosfodiesterase do tipo 3A (PDE3A), enzima que hidrolisa o AMPc em 5'-AMP e interrompe sua ação no oócito (Tsafriri *et al.*, 1996; Franciosi *et al.*, 2014). Desta forma, altos níveis de AMPc mantém elevada a atividade da proteína quinase A (PKA), que indiretamente conserva a fosforilação inibitória de componentes do ciclo celular e impede a ativação do fator promotor da maturação (MPF), reforçando assim, a parada meiótica (Conti *et al.*, 2012; Clarke, 2018). Entretanto, uma vez que essa sinalização é interrompida ocorre a redução do AMPc no oócito e consequentemente a retomada da meiose (Gilchrist *et al.*, 2016) (Figura 1).

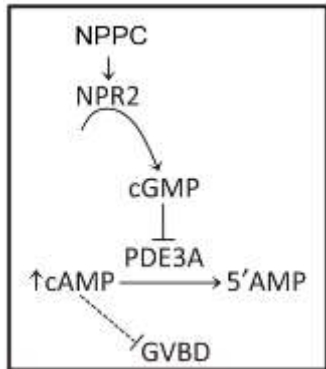


Figura 1. Representação esquemática da coordenação de GMPc e AMPc no controle da parada meiótica. A estimulação do receptor peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2) induzida pelo peptídeo natriurético tipo C (NPPC) nas células da granulosa mural e do *cumulus* aumenta as concentrações intracelulares de GMPc em ambas as células. A manutenção da funcionalidade das junções gap permite a passagem do GMPc até o oócito, impedindo que a fosfodiesterase do tipo 3A (PDE3A) hidrolise o AMPc em 5'AMP, o que mantém os níveis de AMPc suficientes para inibir a quebra de vesícula germinativa (GVBD). Fonte: adaptado de Gilchrist *et al.* (2016).

A maturação do oócito é iniciada fisiologicamente pelo pico pré-ovulatório de LH que, após ser liberado pela glândula pituitária anterior, se liga ao seu receptor (LHR) nas MGCs do folículo ovariano e promove a desfosforilação e inativação de NPR2, diminuindo assim, a produção de GMPc (Liu *et al.*, 2014; Shuhaibar *et al.*, 2016). Essa

155 ligação também proporciona a liberação de ligantes como ampirregulina (AREG),
156 epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC), peptídeos semelhantes ao fator de
157 crescimento epidermal (EGF-like), que apresentam efeitos autócrinos nas MGCs e ações
158 parácrinas nas CCs por meio de seus receptores de EGF (EGFR) presentes em ambas as
159 células (Freimann *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2013a).

160 A ação dos fatores EGF-like é dependente das desintegrinas e metaloproteinases
161 (ADAMs), responsáveis pela clivagem da membrana celular e liberação dos mesmos em
162 sua forma ativa (Ben-Ami *et al.*, 2006) e a partir disto, os EGF-like se ligam com
163 diferentes especificidades a quatro receptores da família EGFR nas CCs, também
164 conhecidos como ErbB ou HER (Sahin *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 2006; Shimada and
165 Yamashita, 2011). A subfamília dos EGFRs pertence à superfamília de receptores
166 transmembranários do tipo tirosina quinase e inclui ErbB1/EGFR/HER1,
167 ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 (Yarden and Sliwkowski, 2001; Zeng
168 and Harris, 2014) e a maioria dos EGF-like se ligam ao ErbB1/EGFR/HER1 (Shimada *et al.*,
169 2016). Quando ligados, ocorre a autofosforilação do receptor e, consequentemente, a
170 ativação de vias de sinalização subsequentes e diferentes respostas, incluindo a regulação
171 da expressão gênica, proliferação celular e ativação das MAPK/ERKs e PI3K/AKT
172 (Harris *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 2006; Prochazka *et al.*, 2012; Chen *et al.*,
173 2013), vias presentes na cascata ovulatória (revisado por Gilchrist, 2011) importantes
174 para a retomada da meiose e a expansão das CCs (Freimann *et al.*, 2004).

175 A ativação de ERK1/2 estimula uma cascata de indução de prostaglandina E2 (PGE2)
176 e p38MAPK e, com os altos níveis de AMPc, amplificam a expressão dos EGF-like nas
177 MGCs e CCs (Shimada *et al.*, 2006; Prochazka *et al.*, 2012). Além disso, a ERK1/2
178 também auxilia na ativação de fatores que induzem a fosforilação das conexinas, o que
179 promove o fechamento das GJ responsáveis por regular o transporte de GMPc e AMPc
180 entre as células (Granot and Dekel, 2002; Norris *et al.*, 2008). Assim, cessa-se a ação
181 inibitória do GMPc sobre a PDE3A no oócito e a mesma aumenta sua atividade sobre o
182 AMPc provocando sua degradação e consequente ativação do MPF (Millar and Russell,
183 1992). O MPF fosforila as proteínas que circundam o envelope nuclear alterando a
184 condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto, resultando na GVBD e
185 retomada da meiose (van den Hurk and Zhao, 2005; revisado por Gilchrist, 2011) (Figura
186 2). Em contrapartida, a manutenção do estado funcional das GJ e do fluxo de GMPc e

AMPC entre as CCs e o oócito posterga a condensação da cromatina e prolonga a atividade transcricional dos oócitos em bovinos (Luciano *et al.*, 2011).

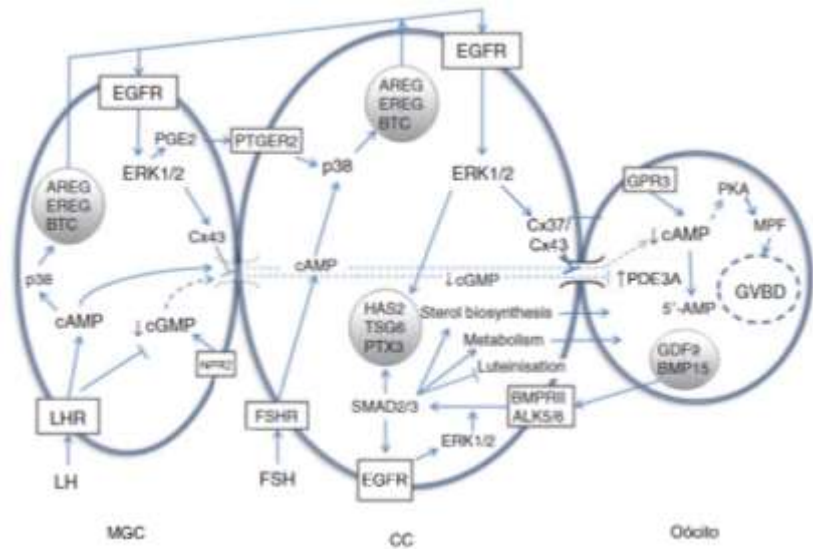


Figura 2. Representação esquemática do controle da retomada meiótica. *In vivo*, o pico de LH ativa o seu receptor (LHR) e provoca desfosforilação e inativação de NPR2, o que diminui a produção de GMPc nas células da granulosa mural (MGC). Essa ligação, na presença de altos níveis de AMPc, também ativa a cascata p38MAPK e induz a expressão de EGF-like [ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC)]. Após ativação, os EGF-like se ligam aos seus receptores (EGFR) presentes tanto nas MGCs quanto nas células do cumulus (CCs) e promovem a autofosforilação dos mesmos, o que permite a ativação da via ERK1/2. Esta via induz a liberação de prostaglandina E2 (PGE2) e ativação de p38MAPK, amplificando a expressão dos EGF-like nas MGCs e CCs, além disso, ERK1/2 auxilia na fosforilação das conexinas (Cx-37 e Cx-43) que induz o fechamento das junções gap responsáveis por regular o transporte de GMPc e AMPc entre as células, comprometendo a ação inibitória de GMPc sobre a PDE3A no oócito. AMPc também é sintetizado de maneira autônoma no oócito por receptores acoplados à proteína G constitutivamente ativo (GPR3). A PDE3A hidrolisa AMPc em 5'-AMP, prejudicando a atividade da PKA e consequente ativação do MPF, que fosforila proteínas que circundam o envelope nuclear, resultando na quebra da vesícula germinativa (GVBD) e retomada da meiose. O oócito secreta fatores BMP15 e GDF9 que ativam a via SMAD2/3 após se ligarem aos seus receptores nas CCs. Esta via regula a biossíntese de esteroides, luteinização e metabolismo energético da célula, além de induzir a expressão de genes relacionados com a expansão do cumulus [hialurona sintase 2 (HAS2), fator de necrose tumoral 6 (TNFAIP6 ou TSG6) e pentraxina 3 (PTX3)]. A sinalização EGFR também está envolvida na expressão destes genes e expansão do cumulus. *In vitro*, o FSH ativa seu receptor (FSHR) e estimula a expressão

de EGF-like via p38MAPK e consequente ativação de fatores que promovem a retomada da meiose. Fonte: adaptado de Gilchrist (2011).

O FSH é amplamente utilizado em diversos protocolos de maturação *in vitro* (MIV) para induzir a maturação oocitária, devido a presença de seus receptores nas CCs e estímulo da expressão e produção dos peptídeos AREG e EREG (bovinos, Van Tol *et al.*, 1996; humanos, Freimann *et al.*, 2004; camundongos, Park *et al.*, 2004; bovinos, Caixeta *et al.*, 2013a). Concentrações suprafisiológicas de FSH precipitam o fechamento das GJ, enquanto que concentrações mais baixas permitem a manutenção da comunicação intercelular entre o oócito e as CCs (Ali and Sirard, 2002). Especula-se que concentrações de FSH próximas às intrafoliculares regulam a fosforilação da conexina 43 (Cx-43), favorecendo a abertura das GJ (Luciano *et al.*, 2011). Estudos demonstram que a substituição de altas concentrações de FSH no meio MIV por AREG, um indutor fisiológico da maturação do COC, determina produção embrionária semelhante à proporcionada pelo FSH (Soares *et al.*, 2017). No entanto, a AREG favorece o metabolismo do COC aferido pelo consumo de glicose e produção de lactato e, na presença de fatores secretados pelo oócito (OSF), melhora a qualidade embrionária medida pelo número de células (Sugimura *et al.*, 2014). Adicionalmente, a suplementação do meio MIV com fatores EGF-like pode melhorar a competência de desenvolvimento de oócitos em relação à MIV convencional, sendo esta induzida exclusivamente por gonadotrofinas (Richani *et al.*, 2013; Richani and Gilchrist, 2018; Prochazka and Nemcova, 2019).

2.3. Controle da expansão das células do cumulus

As gonadotrofinas estão diretamente relacionadas com o processo de expansão das CCs, uma vez que induzem a produção de ácido hialurônico (HA), essencial para dispersão das CCs e formação de uma matriz gelatinosa (Buccione *et al.*, 1990), e a síntese de proteínas que organizam e estabilizam esta matriz (Yokoo and Sato, 2004). *In vivo*, esse estímulo é proveniente do pico pré-ovulatório de LH, já *in vitro*, o estímulo para a expansão das CCs e maturação do oócito ocorre via FSH ou via EGF-like diretamente, sendo que ambos culminam na ativação dos receptores EGFR.

A 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 esses genes, como o HA sintetizado pelo gene *HAS2*, interagem no meio extracelular para que ocorra formação da matriz extracelular das CCs e a consequente expansão do *cumulus*. A expressão dos genes *PTX3*, *HAS2*, *COX2* e *TSG6* mostrou-se positivamente associada com o potencial de desenvolvimento embrionário e, por isso, esses genes são considerados marcadores da competência oocitária nas CCs (Richards, 2005; Assidi *et al.*, 2008; Tesfaye *et al.*, 2009; revisado por Sanchez and Smitz, 2012).

Estudos *in vitro* realizados em oócitos oocetomizados (retirada do conteúdo citoplasmático do oócito microcirurgicamente, mas não da zona pelúcida) demonstraram que a ausência do oócito no COC afeta a expansão das CCs (Buccione *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 2016). Assim, é evidente que o oócito é essencial para a regulação da função celular do *cumulus* a partir de OSF (Buccione *et al.*, 1990; Gilchrist *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2016). Os OSF são membros da família dos fatores de crescimento transformante β (TGF β), como o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) e a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15), e dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) que desencadeiam uma cascata de sinalização após se ligarem aos seus receptores nas CCs (Gilchrist *et al.*, 2008; Sugiura *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2013b; Machado *et al.*, 2015), direcionando tanto o desenvolvimento da matriz gelatinosa da CCs bem como a dispersão entre elas (Diaz *et al.*, 2006). Vários OSF foram estudados e ainda são alvos de pesquisas (GDF9, Dong *et al.*, 1996; BMP15, Galloway *et al.*, 2002; FGF8, Buratini *et al.*, 2005; FGF10, Buratini *et al.*, 2007; BMP15, GDF9 e FGF8, Sugiura *et al.*, 2008; FGF10, Zhang *et al.*, 2010a; BMP15, Caixeta *et al.*, 2013b; FGF10, Castilho *et al.*, 2015; FGF17 e BMP15, Machado *et al.*, 2015; FGF2, Barros *et al.*, 2019; BMP15, Delgado *et al.*, 2021), pois são essenciais para a foliculogênese e a fertilidade feminina de maneira específica para a espécie. A partir da ativação da cascata sinalizadora desses OFS, o oócito direciona as CCs para realizar funções essenciais para sua própria competência de desenvolvimento, além de provocarem efeitos sobre elas, ressaltando a importância da interação *cumulus*-oócito (Gilchrist *et al.*, 2008).

2.4. Interação *cumulus*-oócito

A comunicação bidirecional entre o oócito e as células somáticas, principalmente as CCs adjacentes, proporciona um microambiente favorável ao desenvolvimento da competência oocitária, definida pela habilidade em completar a meiose, ser fertilizado e progredir na embriogênese (Eppig, 2001; Coticchio *et al.*, 2014; Dumesic *et al.*, 2015). Estudos anteriores demonstraram que oócitos desnudos amadurecem a taxas muito mais baixas do que COCs intactos e a co-cultura de COCs com oócitos desnudos pode recuperar parte do potencial perdido com a denudação (Luciano *et al.*, 2005; Sutton-McDowall *et al.*, 2010).

Dentre os efeitos do oócito sobre as CCs, destacam-se a prevenção contra apoptose e a capacidade de secretar fatores que agem via sinalização parácrina nas CCs e nas MGCs, como a expressão de kit ligante e dos OFS (Gilchrist *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2013b; Dumesic *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2019). Já as CCs apresentam papel fundamental no crescimento, metabolismo e maturação oocitária, uma vez que são responsáveis pelo suporte nutricional necessário para o desenvolvimento do oócito (Sutton-McDowall *et al.*, 2010; Abbassi *et al.*, 2021), bem como a transferência de AMPc, GMPc e mRNAs (Buccione *et al.*, 1990; Haghighat and Van Winkle, 1990; Macaulay *et al.*, 2014).

Esta comunicação entre o oócito e as CCs adjacentes, também conhecida por corona radiata, pode ser via secreção de fatores parácrinos e por projeções citoplasmáticas transzonais (TZP), caracterizadas por extensões das CCs que penetram a zona pelúcida e atingem o citoplasma do oócito, permitindo o intercâmbio de moléculas pequenas através das GJ no ponto de contato entre ambas as células (Albertini *et al.*, 2001; Abbassi *et al.*, 2021) e de moléculas maiores por meio de sinapse gamética, ou seja, quando ocorre a transferência intercelular mediada por microvesículas, sendo estas compostas por mRNA poliadenilado que serão utilizados na tradução de proteínas essenciais para auxiliar a competência oocitária (Macaulay *et al.*, 2014; Macaulay *et al.*, 2016).

As GJ são constituídas de seis unidades idênticas (hexamêros de proteínas pertencentes à família das conexinas), que formam um túnel comunicante com um poro central (Santiquet *et al.*, 2013), o qual permite a passagem de moléculas pequenas e hidrofílicas como AMPc, GMPc e piruvato, importantes para o crescimento, metabolismo

e controle da maturação oocitária (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Para obter energia, o oócito depende da fosforilação oxidativa da adenosina tri-fosfato (ATP) realizada pelas mitocôndrias, mas apresenta baixa capacidade de oxidar a glicose. Desta forma, as CCs realizam a glicólise e fornecem piruvato diretamente ao oócito através das GJ (revisado por Richani *et al.*, 2021).

A interação *cumulus*-oócito também é marcada pela sinalização parácrina, uma vez que diversos OFS participam da regulação do desenvolvimento das CCs (revisado por Gilchrist *et al.*, 2008). Dentre eles, destacam-se GDF9 e BMP15, que, além de participarem da regulação da maturação oocitária, são fundamentais para o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais por atuarem na diferenciação das células da granulosa em CCs, juntamente com FGFs (Juengel and McNatty, 2005; revisado por Richani *et al.*, 2021). A sinalização desses OFS ativa a via SMAD2/3 e estimula tanto a expressão de EGFR como a produção de HA (Simpson *et al.*, 2010; Meran *et al.*, 2011), influenciando a expansão das CCs e a maturação oocitária.

Além disso, os FGFs podem interferir nas funções das CCs por meio do padrão de expressão gênica e da influência sobre a expansão das CCs e o metabolismo energético (Buratini *et al.*, 2005; Sugiura *et al.*, 2005; Buratini *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2009; Caixeta *et al.*, 2013b; Castilho *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2015; Richani *et al.*, 2021). Desta forma, a interação *cumulus*-oócito é essencial para a competência oocitária e também para o desenvolvimento das CCs, sendo esta mediada por mecanismos que apresentam melhores resultados quando o COC está em sincronia.

2.5. Neurorregulina 1 (NRG1)

A família dos EGFs compreende 11 proteínas, incluindo o próprio EGF e 10 EGF-*likes*: fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina (HB-EGF), fator de crescimento transformador- α (TGF α), mitogênio epitelial (EPGN), neurorregulinas 1-4 (NRG1-4), AREG, EREG e BTC, todos com propriedades estruturais e funcionais semelhantes (revisado por Shimada *et al.*, 2016). Entretanto, as NRGs não atuam no receptor EGFR como o restante dos membros de sua família, mas possuem alta afinidade para ErbB3 e ErbB4, uma vez que NRG1-2 se ligam aos ErbB3-4 e NRG3-4 ao ErbB4 (Richani and Gilchrist, 2018). O ErbB3 apresenta o domínio de ligação ao ligante, mas

não o domínio tirosina quinase, necessário para a ativação deste tipo de receptor. Diante disto, a formação de heterodímero entre ErbB3 e ErbB2 é essencial para a indução da sinalização, devido a presença do domínio tirosina quinase neste outro e possibilidade de fosforilação de ambos, promovendo a ativação (Ceresa and Peterson, 2014). Durante a ovulação de camundongos, esse heterodímero foi detectado, juntamente com a expressão de NRG1, indicando que os ligantes para ErbB3 são expressos e secretados nesse processo (Noma *et al.*, 2011)

A NRG1 é expressa e secretada a partir de MGCs e atua nas MGCs e CCs após o pico pré-ovulatório de LH (Shimada *et al.*, 2016; Richani and Gilchrist, 2018). Sua principal função está em regular as cascatas intracelulares ativadas pelos demais fatores EGF-like, principalmente a AREG (Falls, 2003; Noma *et al.*, 2011; Shimada and Yamashita, 2011), ideal para prevenir a progressão prematura da meiose e posterior fertilização anormal (Shimada, 2014). Como o gene *NRG1* não é produto direto das CCs, o mesmo não foi detectado entre os genes diferencialmente expressos em COCs maturados *in vitro* de camundongos, no entanto, *NRG1* é deficiente devido à ausência de MGCs neste modelo de cultivo, o que pode explicar a maturação nuclear precoce de oócitos maturados *in vitro* (Kawashima *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2017).

Em geral, os EGF-like, particularmente AREG, aumentam a atividade das vias ERK1/2 e PKC nas CCs (Falls, 2003; Noma *et al.*, 2011; Shimada and Yamashita, 2011), entretanto, a NRG1 diminui a atividade da PKC a um nível fisiológico por meio da redução dos níveis de cálcio intracelular, o que retarda a retomada meiótica e ajusta a maturação nuclear e citoplasmática ao tempo de ovulação (Shimada *et al.*, 2016). A via PKC atua diretamente na fosforilação das conexinas presentes nas GJ entre as CCs e o oócito, causando seu fechamento precoce. Assim, ao regular a ativação dessa via, a NRG1 atrasa a retomada meiótica resultando na liberação de oócitos maduros com competência de fertilização (Lampe *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2016) (Figura 3).

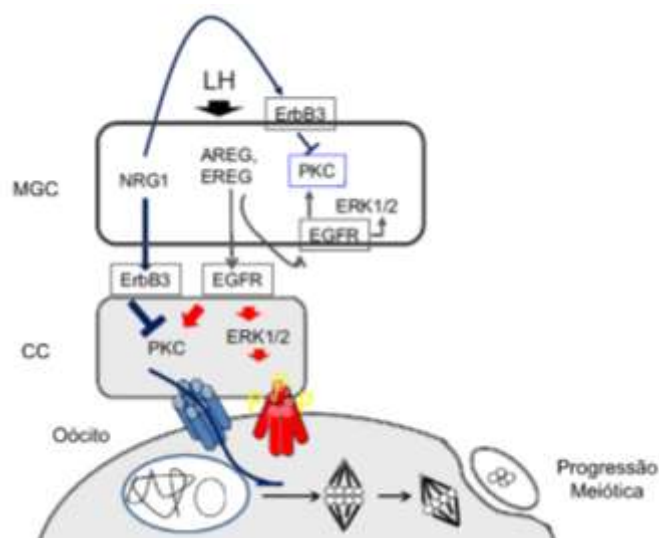


Figura 3. Representação esquemática dos papéis de EGFR e NRG1 durante a maturação oocitária. O pico pré-ovulatório de LH induz a expressão de fatores EGF-like [ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e neurorregulina 1 (NRG1)] em células da granulosa mural (MGC). AREG e EREG atuam no receptor EGFR, expressos tanto nas MGCs quanto nas células do *cumulus* (CC), para estimular a via ERK1/2 e a PKC. Ambas as vias ativam expressões gênicas envolvidas no processo de ovulação, no entanto, a ativação irregular de PKC acelera a progressão meiótica do oócito devido ao fechamento precoce das junções gap entre as CCs e o oócito. NRG1 atua no receptor ErbB3, presente nas MGCs e CCs, e diminui a atividade de PKC para um nível fisiológico, o que retarda a retomada meiótica e ajusta o tempo de maturação oocitária ao tempo de ovulação. Fonte: adaptado de Shimada *et al.* (2016).

Estudos anteriores mostraram que a NRG1 desempenha um papel importante durante o processo de maturação dos COCs em camundongos (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014) e suínos (Mao *et al.*, 2012). Noma *et al.* (2011) avaliaram o efeito sinérgico da NRG1 tipo III com AREG durante a MIV de COCs de camundongos e demonstraram que a NRG1 atua na ativação da AREG e juntas aumentaram a atividade de ERK1/2 e a competência oocitária, regulando as alterações temporais necessárias para a retomada meiótica e a competência oocitária. Mao *et al.* (2012) constataram que a suplementação de NRG1 provoca replicação mitocondrial, aumenta o número de cópias do mtDNA em oócitos MII em comparação com oócitos GV e aumenta a porcentagem de blastocisto em embriões partenogênicos e fertilizados *in vitro* de porcos. O número de cópias do mtDNA é uma consideração importante, já que o objetivo é melhorar a qualidade do oócito e a competência de desenvolvimento em tecnologias *in vitro*. Além disso, camundongos *knockout* para o gene *NRG1* nas GCs apresentaram retomada meiótica e

progressão para MII mais rápidas do que observadas em animais selvagens, além da redução a atividade de ERK1/2, o que comprometeu o sucesso de fertilização dos oócitos maduros e consequente competência para desenvolvimento (Kawashima *et al.*, 2014). Estes relatos mostram que a NRG1 desenvolve um papel importante durante o processo de maturação dos COCs, porém ainda não foi investigado seu efeito na MIV de COCs bovinos.

3. HIPÓTESE

- A adição de NRG1 ao meio MIV regula a retomada da meiose;
- Ao regular a retomada da meiose, a NRG1 melhora a competência oocitária e, consequentemente, o desenvolvimento embrionário;

4. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da adição de NRG1 ao meio MIV sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos.

CAPÍTULO II

Artigo preparado para ser submetido para publicação na revista

Theriogenology

O artigo está apresentado de acordo com as normas de submissão exigida pela revista

**Título: Neuregulin 1 modulates meiotic resumption during amphiregulin-induced
IVM and improves post-IVF embryo development in cattle**

Neuregulin 1 modulates meiotic resumption during amphiregulin-induced IVM and improves post-IVF embryo development in cattle

Thaisy Tino Dellaqua^a, Renan Aparecido Vígaro^a, Ludimila Cardoso Zoccal Janini^b, Jose Buratini^{ac}.

^a Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

^b Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

^c Biogenesi, Reproductive Medicine Centre, Monza, Italy

Correspondence:

Thaisy Tino Dellaqua

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University

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

Telephone/Fax: (55) 14.38800330

E-mail: thaisydellaqua@hotmail.com

ABSTRACT

Oocyte *in vitro* maturation (IVM) has been recognized as a major bottleneck of assisted reproductive technologies (ART) applied in animal production. The induction of the ovulatory cascade with EGF-like ligands instead of supraphysiological concentrations of FSH during IVM has provided promising results in cattle IVP, although it may accelerate meiotic resumption potentially compromising nuclear/cytoplasmic tuning. The objective of this study was to assess the effects of neuregulin 1 (NRG1), a particular EGF-like factor that modulates EGFR-induced pathways, on meiotic dynamics, *cumulus* expansion and embryo production following IVM, using amphiregulin (AREG) as the maturation trigger, and IVF in cattle. Although we did not observe any impact of NRG1 supplementation on the percentage of COCs reaching full *cumulus* expansion, NRG1 at 1 ng/mL delayed the germinal vesicle breakdown during IVM induced with AREG and improved post-IVF embryo development in cattle, increasing the production of transferable embryos and total embryonic cell number. The present study provides novel evidence that NRG1 is involved in the mechanisms that control meiotic resumption in cattle, being a potential useful tool to improve the efficiency of current IVM/IVP protocols.

Keywords: NRG1, IVM, post-IVF, AREG, PKC.

1. INTRODUCTION

In vitro maturation (IVM) of *cumulus*-oocyte complexes (COC) is a crucial and limiting step for embryo *in vitro* production (IVP) in the context of ART (Assisted Reproductive Technologies) applied to animal production [1]. *In vitro* matured oocytes are less competent to be fertilized and reach the blastocyst stage as compared with *in vivo* matured oocytes [2]. This indicates that IVM can be improved by reflecting more closely the physiological conditions under which the oocyte matures. Notably, the efficiency of IVM is also determined by the oocyte's intrinsic developmental competence, which requires a fine tuning between the mechanisms controlling nuclear and cytoplasmic maturation [3, 4]. This fine tuning is largely dependent on the direct interaction between *cumulus* cells (CCs) and the oocyte through gap junctions (GJ), present at the end of transzonal projections (TZP), that transfer small regulatory factors and metabolites into the oocyte [5]. In addition and interestingly, TZPs also deliver *cumulus*-derived polyadenylated RNA in micro-vesicles that are released in the so-called gametic synapse to be then incorporated by the oocyte to control meiosis and gene expression [6, 7].

In most mammalian species, oocytes enter the early stages of meiosis during fetal life and then remain arrested at the diplotene stage of prophase I, a phase also known as the germinal vesicle (GV), until they are committed to ovulation [3]. *In vivo*, meiotic resumption is triggered by the LH preovulatory surge, after which nuclear maturation progresses to metaphase II (MII), to be then interrupted again until fertilization [8]. LH activates a G protein-coupled receptor (LHR) in MGCs, increasing intracellular levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), which strongly enhances the expression of epidermal growth factor (EGF)-like molecules, namely amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG) and betacellulin (BTC) [9, 10]. These EGF-like factors, through the activation of the ERK1/2 pathways upon binding to the EGF receptor (EGFR or ErbB1), trigger a large network of genes in MGCs and CCs leading to *cumulus* expansion and ovulation [11]. Meiotic resumption is specifically promoted by the interruption of *cumulus*-derived cyclic guanosine monophosphate (cGMP) transfer to the oocyte; cGMP protects cAMP from phosphodiesterase 3 (PDE3) thus sustaining the inhibition of the maturation promoting factor (MPF) by cAMP before the LH surge [1, 12]. The interruption of cGMP delivery appears to result from GJ closure due to phosphorylation of connexins [13], but also from the activation of mechanisms causing TZP retraction; recent findings suggest that LH-

mediated ERK1/2 activation can induce TZP retraction by dismantling E-cadherin/N-cadherin connections and promoting TZP-actin contraction [14].

Recently, neuregulin 1 (NRG1), another member of the EGF-*like* family which expression is stimulated by the LH surge in granulosa cells, was suggested to be an important modulator of the ovulatory process [15]. NRG1 is secreted by MGCs in response to LH and selectively binds to the ErbB3 receptor in MGCs and CCs during ovulation [16]. Through the modulation of the intracellular pathways triggered by EGF-*like* peptides, particularly AREG, NRG1 appears to play an important regulatory role during final oocyte maturation in mice [16, 17]. Curiously, NRG1 reduced calcium levels and PKC activity to physiological levels in murine CCs under AREG stimulation, which was accompanied by a decrease in the speed of meiotic progression [15, 17]. The PKC pathway directly phosphorylates GJ connexins causing their closure and thus anticipating the interruption of *cumulus*-oocyte communication [18]. Therefore, NRG1 has been suggested to prevent premature progression to the MII stage, thus contributing to oocyte nuclear/cytoplasmic maturation synchrony and developmental competence [15]. In addition, NRG1 supplementation during IVM enhanced the expression of *Tnfrsf10b*, a gene involved in *cumulus* expansion, in CCs and increased the percentage of oocytes reaching the cleavage stage following IVF in mice [16].

Therefore, the inclusion of NRG1 in an IVM protocol utilizing EGF or EGF-*like* factors to induce the ovulatory cascade may benefit oocyte developmental competence by promoting better nuclear/cytoplasmic maturation tuning. We have recently proposed a more physiological IVM strategy inducing oocyte maturation with AREG in the presence of intrafollicular concentrations of IGF-1, FSH and steroids (follicular system – FS) [19]. The objective of this study was to investigate the effects of the supplementation of the FS-IVM medium with NRG1 on oocyte meiotic progression and embryo development following IVF in cattle.

2. MATERIAL AND METHODS

All products were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise specified.

2.1. Experimental design

2.1.1. Experiment 1: Effects of NRG1 supplementation on oocyte maturation dynamics during IVM induced with AREG (FS)

To study the effects of NRG1 supplementation in IVM medium on oocyte nuclear maturation, four concentrations of NRG1 were added to FS maturation medium: 0, 1, 10, or 100 ng/mL (Recombinant human neuregulin 1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The FS medium consists in TCM199 containing Earle's salts supplemented with 4 mg/mL fatty acid free bovine serum albumin (BSA), 75 µg/mL amikacin, 22 µg/mL sodium pyruvate, 1 mM cysteamine, 0.01 UI/mL recombinant human FSH (r-hFSH, Gonal-f, Merck Serono, Bari, Italy), 50 ng/mL 17β-estradiol, 150 ng/mL progesterone, 10 ng/mL IGF-1 and 100 ng/mL AREG [19]. Five biological replicates were performed as described below. During IVM, the meiotic progression was evaluated after different times of culture for investigation to: 0h – GV, 6h - GVBD, 9h and 12h - metaphase I (MI), and 20h and 24 h - MII. In addition, *cumulus* expansion was visually assessed after 24 h of culture.

2.1.2. Experiment 2: Effects of NRG1 supplementation during IVM induced with AREG (FS) on embryo production

Experiment 2 determined the effects of NRG1 treatment during IVM on embryo development. COCs were matured with FS medium (the same as experiment 1) in presence of 1 ng/mL NRG1 or not. After 24 hours of IVM, the COCs were fertilized and cultured as described below. Five biological replicates were performed to determine the blastocyst yield of total embryos, expanded and hatched blastocyst rates, and the total cell number after 7 days of IVC.

2.2. COCs collection and in vitro maturation

Ovaries of adult cows were obtained at near slaughterhouse at Torrinha (22° 25' 34" S, 48° 10' 09" W) and Bariri (22° 4' 28" S, 48° 44' 26" W) and transported to Sao Paulo State University - Campus of Botucatu in sterile saline solution (0.9% NaCl) at 38°C. COCs were aspirated from 2 - 8 mm diameter follicles with an 18-gauge needle and pooled in a 15 mL conical tube. After sedimentation, COCs were recovered and

selected using a stereomicroscope. Only COCs with homogenous cytoplasm and at least three compact layers of CCs were used (grades 1 and 2) for further experiments [20]. The selected COCs (25-35 COCs/group) were cultured in 500 µL IVM medium in four-well plates at 38.5°C and 5,5% CO₂ in humidified air during the times determined for each experiment. Subsequently, COCs were transferred to IVF medium or submitted to *cumulus* expansion analysis and meiotic progression after denuded. For *cumulus* expansion assessment, COCs were visually classified to increasing degrees of CCs expansion after 24 hours of IVM as previously described [21] and the COCs with complete or nearly complete expansion (grade 3) were used for statistical analysis.

2.3. *In vitro* fertilization and embryo culture

IVF and embryo culture were adapted as previously described [19]. Briefly, the matured COCs were washed in IVF medium and placed in four-well plates with 300 µL IVF medium (BotuFIV® BotuPharma, Botucatu, SP, Brazil). The contents of a straw of cryopreserved Nelore bull semen were thawed at 37°C for 30s and spermatozoa were separated on a 45–90% Select SPERM gradient (BotuFIV®, BotuPharma, Botucatu, SP, Brazil). Spermatozoa were counted and added into each well to a final concentration of 2×10⁶ cells/mL. COCs and spermatozoa were incubated at 38.5°C in a saturated humidity atmosphere containing 5.5% CO₂ for 18 hours. After, the presumptive zygotes were denuded of the remaining surrounding CCs by vortexing. Embryo culture was performed in four-well plates using 500 µL IVC medium (BotuFIV®, BotuPharma, Botucatu, SP, Brazil) supplemented with 2.5% FBS during 7 days in a humid controlled atmosphere (5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂) at 38.5°C. After IVC, the blastocyst rate was assessed under a stereomicroscope and blastocysts were morphologically classified as not expanded, expanded, and hatched [22]. The embryos were fixed in methanol 60% and total embryonic cell number were counted under a fluorescence microscope after staining with 1 µg/mL Hoechst 33342.

2.4. *Assessment of meiotic progression*

All the oocytes were denuded by pipetting in phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 60% methanol and stained with 1 µg/mL Hoechst 33342. Chromatin status and

meiotic staging were determined by epifluorescence microscopy. Oocytes at the GV and GVBD stage were classified according to rupture of GV (before: GV; after: GVBD). The meiotic staging was classified in MI, MII, or degenerated (DEG) [23, 24].

2.5. Statistical analysis

Data in percentages were arcsine transformed before analysis. The effects of treatment with NRG1 on meiotic progression, embryo development rates, and embryo cell number were tested by Shapiro-Wilk test to verify normality. Means were compared with Tukey–Kramer/Student test (parametric data) or Kruskal-Wallis/Wilcoxon test (non-parametric data). Data are presented by mean $\pm$ S.E.M. and differences were considered significant when $P < 0.05$. These analyses were performed using JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. RESULTS

Regarding the effects on oocyte maturation dynamics, when added to the FS-IVM medium (AREG as maturation inducer) at 1 ng/mL, but not at 10 or 100 ng/mL, NRG1 significantly decreased the percentage of COCs achieving GVBD at 6 hours of IVM in comparison with the control treatment (no NRG1; Fig. 1a). Alternatively, NRG1 did not alter meiotic progression in relation to the control treatment at 9h, 12h, 20h or 24h of IVM (Fig. 1b). In addition, no differences were observed among the groups for the *cumulus* expansion (Fig. 2).

With regard to post-IVF embryo production, although supplementation of the FS-IVM medium (AREG as inducer) with 1 ng/ml NRG1 did not alter blastocyst production rate (Fig. 3a), it significantly increased the percentage of expanded and hatched blastocysts produced [in relation to total blastocyst (Fig. 3b) and to total oocyte (Fig. 3c)] and blastocyst total cell number in comparison with the control treatment (Fig. 4).

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

The detrimental impact of nuclear and cytoplasmic desynchronization during oocyte maturation on developmental competence has been recognized for more than 30

years [25]. Overcoming this challenge is crucial to increase developmental competence following IVM and IVP efficiency [4, 26]. Previous studies have shown that NRG1 is expressed by MGCs and acts on MGCs and CCs after the LH surge to modulate AREG activity and thus meiotic resumption [16, 17]. Herein we provide novel evidence that NRG1 may be utilized during EGF-induced IVM to promote better oocyte nuclear/cytoplasmic maturation tuning and to improve post-IVF embryo development in cattle.

In the present study, NRG1 at 1 ng/mL delayed germinal vesicle breakdown, as indicated by a reduced percentage of GVBD oocytes at 6 hours of IVM, but did not change later meiotic dynamics or MII rates at the end of IVM. This result was suggestive of a better tuning between nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, which motivated us to assess the effects of NRG1 on developmental competence. Indeed, as hypothesized, although NRG1 supplementation during IVM did not alter post-IVF total blastocyst rate in the present study, it did increase the yield of expanded and hatched blastocysts, the subtypes that compose the group of embryos that are actually transferred in bovine IVP practice, as well as total embryo cell number. Taken together, these data clearly indicate a positive impact of NRG1 treatment during IVM induced with AREG on bovine embryo quality and cattle IVP efficiency. These data are in agreement with a previous study reporting a positive effect of NRG1 at 20 ng/mL during EGF-induced IVM on blastocyst rates in pigs [27], and represent the first evidence that this physiological/modulatory system also exists in mono-ovulatory species, in which it may be explored to improve IVP outcomes.

Considering that a drastic decrease in GJ-mediated communication induces GVBD [19, 28-30], and that communication reduction is partly promoted by GJ closure following PKC-induced connexin 43 (Cx-43) phosphorylation [15, 31, 32], we speculate that the effect of NRG1 on GVBD may be a consequence of its inhibitory effect on PKC activity [17]. Indeed, although Cx-43 phosphorylation appears to be predominantly induced by EGF-activated ERK1/2 in CCs, this connexin also contains responsive sites to phosphorylated PKC [18, 33]. Decreased *cumulus*-oocyte communication would then result in reduced levels of cGMP in the oocyte, rendering PDE3A available to degrade cAMP, thus releasing MPF from cAMP inhibitory influence [reviewed by 1]. Increased calcium levels are directly induced by an EGFR-dependent pathway in CCs [31, 34, 35]. In addition, calpain activity was positively associated with intracellular calcium in CCs

cultured with AREG [31], suggesting calcium as an important mediator downstream of ERK1/2 activation in CCs [36]. Interestingly, increased calpain activity has been recently demonstrated to mediate TZP retraction by disconnecting E-cadherin/N-cadherin at the TZP-oocyte interface and stimulating TZP-actin contraction in mice [14]. Therefore, apart from the inhibitory effect of NRG1 on connexin phosphorylation via PKC, it may also contribute for nuclear/cytoplasmic synchrony through a potential protective influence on TZPs via calpain inhibition [14].

The EGFR-ERK1/2 pathway stimulates the expression of genes crucial for *cumulus* expansion [37, 38]. In mice, supplementation of an IVM medium using AREG as maturation promoter with NRG1 increased the expression of *Tnfrsf10b* gene in CCs [16]. Herein, we did not observe any impact of NRG1 supplementation on the percentage of COCs reaching full *cumulus* expansion, suggesting that this is not a process under a strong influence of NRG1, at least under IVM conditions in cattle.

The changes NRG1-mediated during IVM resulted in oocytes that acquired a high degree of developmental competence, suggesting that critical biochemical changes in the oocyte cytoplasm need to follow a precise temporal pattern. The resumption of meiosis is accompanied by extensive reorganization of the cytoplasmic organelles [39] and the protein synthesis and mitochondrial activity are necessary to regulate developmental competence [4, 40]. Mitochondria play an extremely important role since synthesizes the ATP necessary for the synthesis of proteins which, in turn, supports the completion of subsequent maturation processes and embryo development [41, 42]. NRG1 has been shown to increase mitochondrial DNA copy number in the MII oocyte compared with the GV oocyte, in addition, improve the blastocyst rate in pigs [27]. In bovine, oocytes with higher mitochondrial DNA copy numbers also have higher blastocyst development [43, 44]. Furthermore, blastocysts of high quality generally present higher embryonic cell numbers than blastocysts of lower quality [22]. Taken together, our findings suggest that NRG1 promoted better synchronization between oocyte nuclear and cytoplasmic maturation which resulted in improvement in embryo development.

In conclusion, NRG1 at 1 ng/mL delayed germinal vesicle breakdown during IVM induced with AREG and improved post-IVF embryo development in cattle, increasing the production of transferable embryos and total embryonic cell number. Although more studies are necessary to dissect the roles of NRG1 in the regulation of oocyte maturation and developmental competence, we provide evidence that NRG1 is involved in the

mechanisms that control meiotic resumption in cattle, being a potential useful tool to improve the efficiency of current IVM/IVP protocols.

Acknowledgements

The authors thank to Edjalma Rodrigues da Silva Jr for technical assistance. This study was financed in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant number 2019/14588-6) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES).

FIGURES

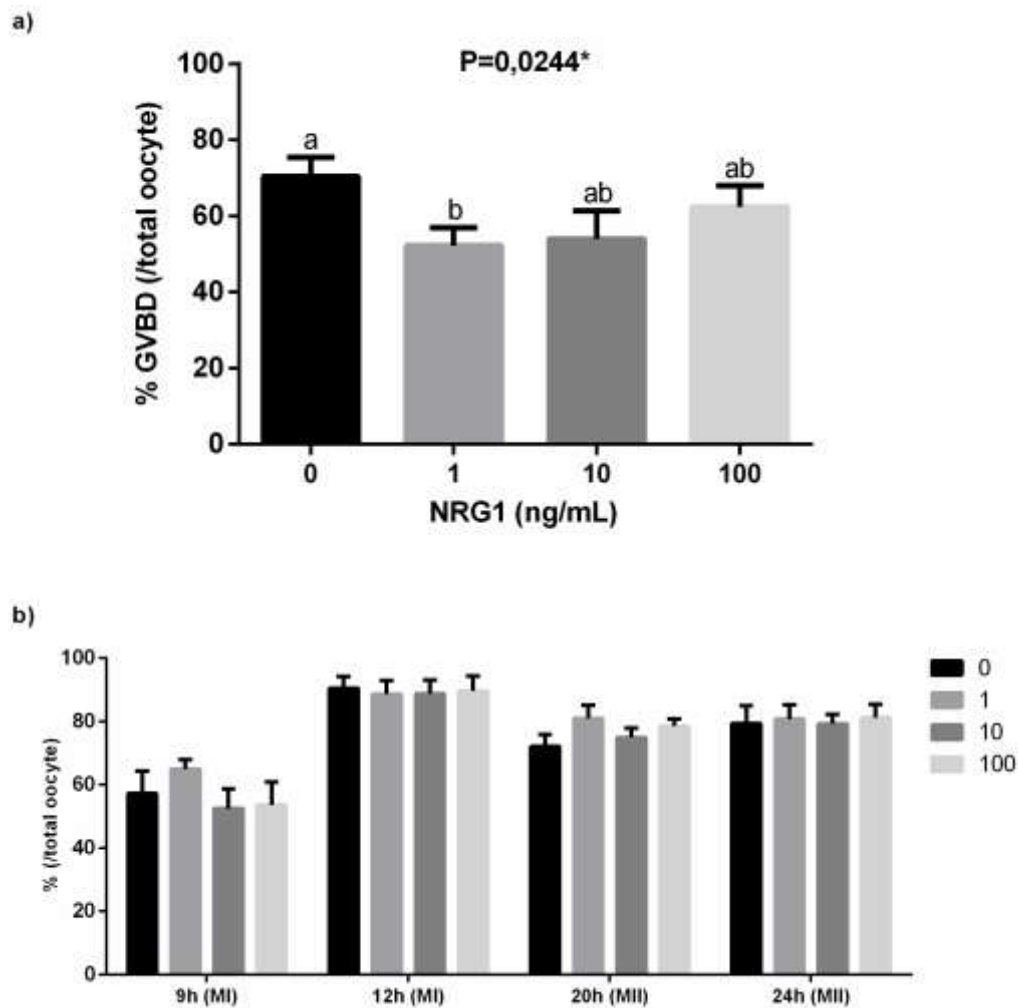


Fig. 1. Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on meiosis progression. COCs were subjected to IVM with FS medium in presence of 0, 1, 10 or 100 ng/mL NRG1 **a)** for 6 hours ($P \leq 0.05$). GVBD: germinal vesicle breakdown. **b)** for 9, 12, 20 or 24 hours ($P > 0.05$). MI: metaphase I; MII: metaphase II. Data are represented by mean $\pm$ S.E.M. of five biological replicates with 124, 134, 119, and 122 at 6h; 121, 123, 120, and 118 at 9h; 160, 151, 160, and 159 at 12h; 115, 129, 124, 125 at 20h; 162, 133, 142, and 146 at 24h of COCs in the 0, 1, 10, and 100 ng/mL NRG1 groups respectively.

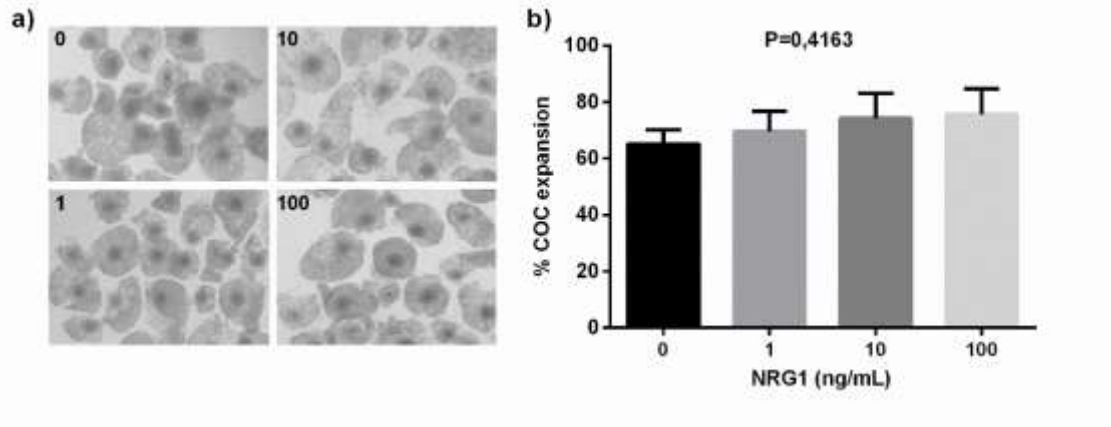
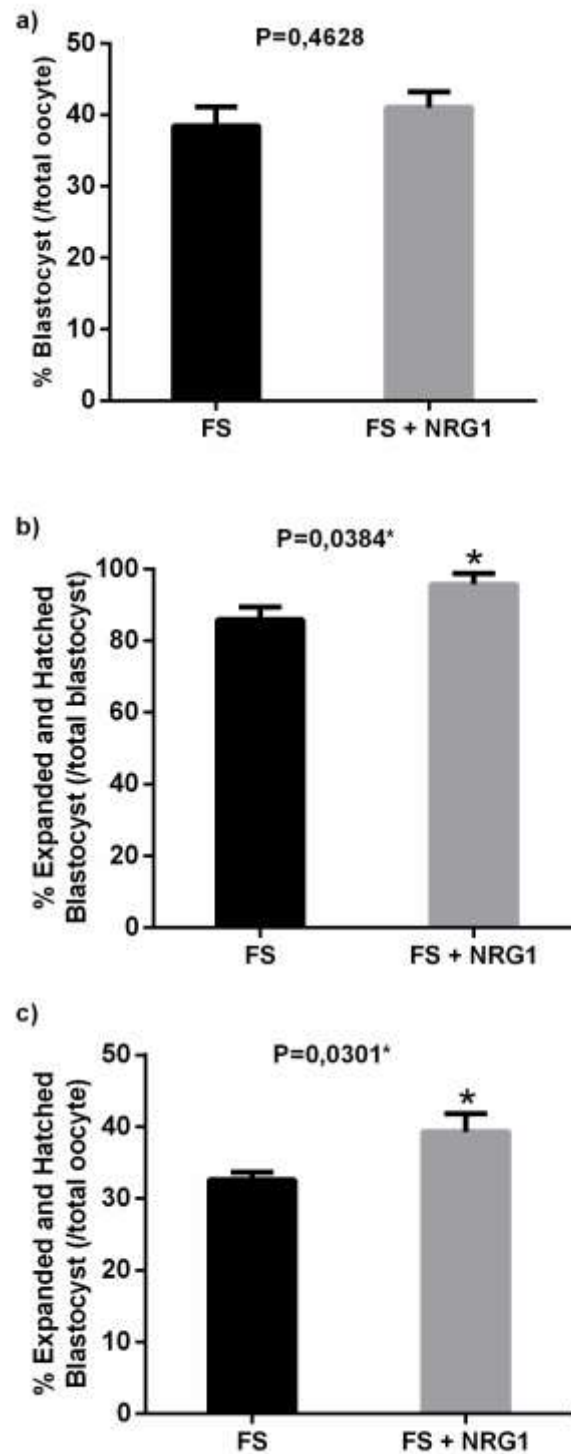


Fig. 2. Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on *cumulus* expansion. COCs were matured with FS medium in presence of 0, 1, 10 or 100 ng/mL NRG1. **a)** Panels show representative images of groups after 24 hours of IVM **b)** Percentage of COCs with complete or nearly complete expansion was calculated in relation to total oocytes ($P > 0.05$). Data are represented by mean $\pm$ S.E.M. of five biological replicates with 157, 151, 153, and 158 COCs in the 0, 1, 10, and 100 ng/mL NRG1 groups respectively.



745

746 **Fig. 3.** Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on embryo production.
747 COCs matured with FS medium in presence of 1 ng/mL NRG1 or not **a)** Blastocyst production
748 rate ($P > 0.05$). **b)** Expanded and hatched blastocysts rate was calculated in relation to total
749 blastocysts ($P \leq 0.05$). **c)** Expanded and hatched blastocysts rate was calculated in relation to total
750 oocytes ($P \leq 0.05$). Data are represented by mean $\pm$ S.E.M. of five biological replicates with 179
751 and 168 COCs in the FS and FS + NRG1 groups respectively.

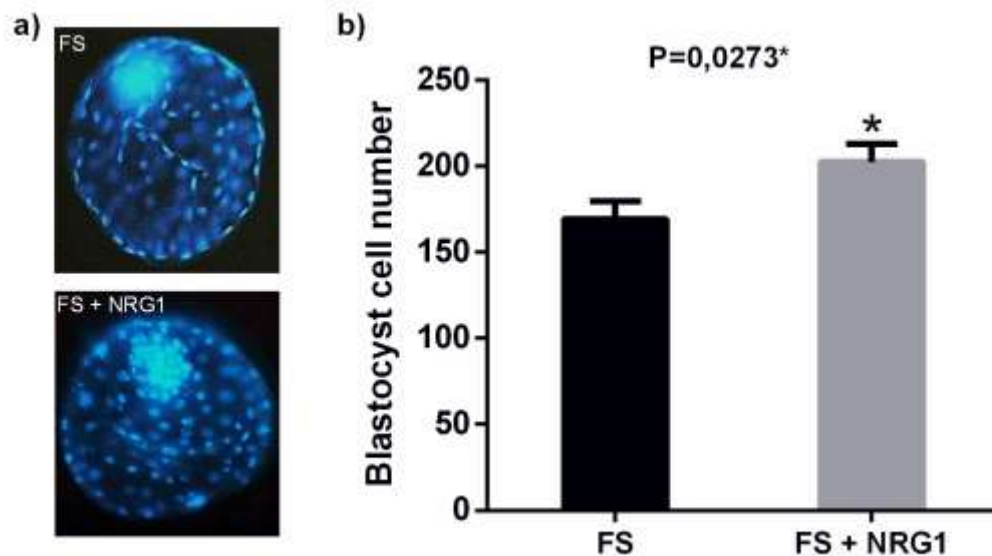


Fig. 4. Effects of NRG1 during IVM induced with AREG (FS medium) on embryo quality. COCs were matured with FS medium in presence of 1 ng/mL NRG1 or not. **a)** Panels show representative images of each blastocyst evaluated after staining with 1 µg/mL Hoechst 33342. Magnification ×400 **b)** Total blastocyst cell number was counted under a fluorescence microscope ($P \leq 0.05$). Data are represented by mean ± S.E.M. of five biological replicates with 55 and 60 embryos in the FS and FS + NRG1 groups respectively.

REFERENCES

- [1] Gilchrist RB. Recent insights into oocyte follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23:23-31.
- [2] 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.* 2002;61:234-48.
- [3] Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in vitro. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016;4:255-68.
- [4] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology.* 2009;71:836-48.
- [5] Richani D, Dunning KR, Thompson JG, Gilchrist RB. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2021;27:27-47.
- [6] Macaulay AD, Gilbert I, Caballero J, Barreto R, Fournier E, Tossou P, et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. *Biol Reprod.* 2014;91:90.
- [7] Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, et al. Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. *Biol Reprod.* 2016;94:16.

777 [8] Pincus G, Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in vivo and in vitro:
778 I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med.* 1935;62:665-75.

779 [9] Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during
780 oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;356:65-73.

781 [10] Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS. Paracrine and
782 autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and
783 granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol*
784 *Endocrinol.* 2006;20:1352-65.

785 [11] Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. EGF-like growth factors as mediators
786 of LH action in the ovulatory follicle. *Science.* 2004;303:682-4.

787 [12] Millar JB, Russell P. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase.
788 *Cell.* 1992;68:407-10.

789 [13] Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, et al. Luteinizing
790 hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap
791 junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development.*
792 2008;135:3229-38.

793 [14] Abbassi L, El-Hayek S, Carvalho KF, Wang W, Yang Q, Granados-Aparici S, et al.
794 Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular
795 compartment at ovulation. *Nat Commun.* 2021;12:01-13.

796 [15] Shimada M, Umehara T, Hoshino Y. Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in
797 the ovulation process. *Reprod Med Biol.* 2016;15:201-16.

798 [16] Noma N, Kawashima I, Fan HY, Fujita Y, Kawai T, Tomoda Y, et al. LH-induced neuregulin
799 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Mol*
800 *Endocrinol.* 2011;25:104-16.

801 [17] Kawashima I, Umehara T, Noma N, Kawai T, Shitanaka M, Richards JS, et al. Targeted
802 disruption of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. *Mol*
803 *Endocrinol.* 2014;28:706-21.

804 [18] Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. Phosphorylation of
805 connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol.*
806 2000;149:1503-12.

807 [19] Soares ACS, Lodde V, Barros RG, Price CA, Luciano AM, Buratini J. Steroid hormones
808 interact with natriuretic peptide C to delay nuclear maturation, to maintain oocyte-cumulus
809 communication and to improve the quality of in vitro -produced embryos in cattle. *Reprod Fertil*
810 *Dev.* 2017;29:2217-24.

811 [20] Khurana NK, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density,
812 cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine
813 embryos. *Theriogenology.* 2000;54:741-66.

814 [21] Zhang K, Hansen PJ, Ealy AD. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte
815 maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction.* 2010;140:815-26.

816 [22] Jakobsen AS, Thomsen PD, Avery B. Few polyploid blastomeres in morphologically
817 superior bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 2006;65:870-81.

818 [23] Roth Z, Hansen PJ. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal
819 elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*.
820 2005;129:235-44.

821 [24] Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. The effect of linolenic Acid on bovine oocyte
822 maturation and development. *Biol Reprod*. 2009;81:1064-72.

823 [25] Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine
824 follicular oocytes. *Reproduction*. 1988;82:127-34.

825 [26] Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, et al. Oocyte maturation
826 and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*. 2016;152:R143-57.

827 [27] Mao J, Whitworth KM, Spate LD, Walters EM, Zhao J, Prather RS. Regulation of oocyte
828 mitochondrial DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during in vitro
829 maturation affects embryo development in pigs. *Theriogenology*. 2012;78:887-97.

830 [28] Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modina SC, Fadini R, et al. Natriuretic peptide
831 precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in
832 bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod*. 2014;91:61.

833 [29] Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V. Gap junction-mediated communications
834 regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-
835 dependent mechanism(s). *Biol Reprod*. 2011;85:1252-9.

836 [30] Atef A, Francois P, Christian V, Marc-Andre S. The potential role of gap junction
837 communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol*
838 *Reprod Dev*. 2005;71:358-67.

839 [31] Kawashima I, Liu Z, Mullany LK, Mihara T, Richards JS, Shimada M. EGF-like factors
840 induce expansion of the cumulus cell-oocyte complexes by activating calpain-mediated cell
841 movement. *Endocrinology*. 2012;153:3949-59.

842 [32] Shimada M, Maeda T, Terada T. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein,
843 in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption
844 in porcine oocytes. *Biol Reprod*. 2001;64:1255-63.

845 [33] Solan JL, Marquez-Rosado L, Sorgen PL, Thornton PJ, Gafken PR, Lampe PD.
846 Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents
847 down-regulation by PKC. *J Cell Biol*. 2007;179:1301-9.

848 [34] Hao X, Wang Y, Kong N, Zhang Y, Zhao Y, Xia G, et al. Epidermal Growth Factor-
849 Mobilized Intracellular Calcium of Cumulus Cells Decreases Natriuretic Peptide Receptor 2
850 Affinity for Natriuretic Peptide Type C and Induces Oocyte Meiotic Resumption in the Mouse.
851 *Biol Reprod*. 2016;95:45.

852 [35] Wang Y, Kong N, Li N, Hao X, Wei K, Xiang X, et al. Epidermal growth factor receptor
853 signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and
854 meiotic resumption in mouse oocytes. *Endocrinology*. 2013;154:3401-9.

855 [36] Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci.*
856 2005;118:3829-38.

857 [37] Assidi M, Dieleman SJ, Sirard MA. Cumulus cell gene expression following the LH surge
858 in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction.*
859 2010;140:835-52.

860 [38] Prochazka R, Blaha M, Nemcova L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-
861 induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction.* 2012;144:535-
862 46.

863 [39] Fan H-Y, Sun Q-Y. *Oocyte Meiotic Maturation*. 3^a ed: The Ovary; 2019.

864 [40] Landim-Alvarenga FC, Maziero RRD. Control of oocyte maturation. *Anim Reprod.*
865 2014;11:150-8.

866 [41] Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. Redistribution of mitochondria leads to
867 bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol.*
868 2010;224:672-80.

869 [42] Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al.
870 Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-
871 83:13-20.

872 [43] Hua S, Zhang Y, Li XC, Ma LB, Cao JW, Dai JP, et al. Effects of granulosa cell mitochondria
873 transfer on the early development of bovine embryos in vitro. *Cloning Stem Cells.* 2007;9:237-
874 46.

875 [44] May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y, Reynier P. Mitochondrial DNA in the Oocyte
876 and the Developing Embryo. *Curr Top Dev Biol.* 2007;77:51-83.

Considerações Finais

Ao longo do desenvolvimento deste projeto, algumas alterações precisaram ser realizadas devido a ocorrência da pandemia da Covid-19. Entretanto, nossos resultados constituem informações inéditas para a produção *in vitro* de embriões bovinos, como o atraso da retomada da meiose ocasionado pela adição de NRG1 ao meio de maturação proporcionando melhorias para o desenvolvimento embrionário, o que promoveu maiores taxas de produção de blastocistos eclodidos e expandidos.

A busca por melhorias na eficiência da maturação *in vitro* em bovinos estimula a pesquisa científica para o desenvolvimento de novas abordagens técnicas, como o desenvolvimento de novos meios de cultivo a fim de aumentar a competência oocitária para suportar etapas subsequentes à maturação e posterior desenvolvimento embrionário. A adição de NRG1 ao meio de maturação associado com AREG e concentrações fisiológicas de FSH, como utilizado no meio MIV do Sistema Folicular deste estudo, foi positivamente relacionada ao aumento da competência oocitária, uma vez que a NRG1 conseguiu suprimir a retomada da meiose durante a maturação.

Nossos achados corroboram com estudos anteriores que indicaram que a suplementação do meio MIV com NRG1 acrescido de AREG proporcionou atraso da retomada da meiose, semelhante ao processo de maturação *in vivo* (Kawashima *et al.*, 2014), além de aumentar taxas de fertilização e clivagem inicial (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014). Outro estudo com NRG1 presente no meio MIV acrescido de EGF mostrou a eficiência deste peptídeo em aumentar o número de cópias do mtDNA em oócitos MII em comparação com oócitos GV e melhorar as taxas de clivagem e produção embrionária (Mao *et al.*, 2012). Assim, a suplementação do meio MIV com fatores EGF-*like* pode melhorar a competência de desenvolvimento de oócitos em relação à MIV induzida exclusivamente com gonadotrofinas (Prochazka *et al.*, 2011; Richani *et al.*, 2013), como encontrado em protocolos comerciais de PIV.

Em conclusão, os dados aqui apresentados contribuem para elucidar os acontecimentos ocorridos durante a maturação *in vitro* e posterior desenvolvimento embrionário. O uso de NRG1 associado à AREG modula a retomada da meiose e aumenta a produção de blastocistos eclodidos e expandidos, além de aumentar o número total de células embrionárias. Esta nova estratégia para a MIV, com uma abordagem mais

909 fisiológica a fim de aproximar o sistema de cultivo *in vitro* ao processo natural de
910 maturação oocitária, pode ser promissora para o aprimoramento da PIV, favorecendo a
911 competência oocitária para a fecundação e desenvolvimento embrionário.

912 **Referências**

- 913 Abbassi L, El-Hayek S, Carvalho KF, Wang W, Yang Q, Granados-Aparici S, Mondadori R, Bordignon
914 V, Clarke HJ. Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular
915 compartment at ovulation. *Nat Commun* 2021;**12**: 01-13.
- 916 Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian
917 follicle development. *Reproduction* 2001;**121**: 647–653.
- 918 Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development
919 of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2002;**66**: 901-905.
- 920 Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the
921 mammalian ovary. *the journal of cell biology* 1976;**71**: 680-686.
- 922 Assidi M, Dieleman SJ, Sirard MA. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine
923 preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction* 2010;**140**: 835-852.
- 924 Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA. Identification of potential
925 markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating
926 hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biol Reprod* 2008;**79**: 209-222.
- 927 Barros RG, Lima PF, Soares ACS, Sanches L, Price CA, Buratini J. Fibroblast growth factor 2 regulates
928 cumulus differentiation under the control of the oocyte. *J Assist Reprod Genet* 2019;**36**: 905-913.
- 929 Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Ron-El R, Amsterdam A. Novel function of ovarian growth
930 factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Mol Hum*
931 *Reprod* 2006;**12**: 413-419.
- 932 Brown HM, Dunning KR, Sutton-McDowall M, Gilchrist RB, Thompson JG, Russell DL. Failure to launch:
933 aberrant cumulus gene expression during oocyte in vitro maturation. *Reproduction* 2017;**153**: R109-R120.
- 934 Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus
935 in vitro is dependent upon a specific factor (s) secreted by the oocyte. *Developmental biology* 1990;**138**:
936 16-25.
- 937 Buratini J, Jr., Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MG, Giometti IC, Barros CM, Cao M, Nicola
938 ES, Price CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast
939 growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction* 2005;**130**: 343-350.
- 940 Buratini J, Pinto MGL, Castilho AC, Amorim RL, Giometti IC, Portela VM, Nicola ES, Price CA.
941 Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor
942 Receptor 2B, in Bovine Follicles. *Biol Reprod* 2007;**77**: 743-750.
- 943 Caixeta ES, Machado MF, Ripamonte P, Price C, Buratini J. Effects of FSH on the expression of receptors
944 for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reprod*
945 *Fertil Dev* 2013a;**25**: 890-899.
- 946 Caixeta ES, Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG, Price CA, Machado MF, Lima PF,
947 Buratini J. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion,
948 glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine
949 cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 2013b;**146**: 27-35.
- 950 Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990;**265**: 7709-7712.
- 951 Castilho ACS, Price CA, Dalanezi F, Ereno RL, Machado MF, Barros CM, Gasperin BG, Goncalves PBD,
952 Buratini J. Evidence that fibroblast growth factor 10 plays a role in follicle selection in cattle. *Reprod Fertil*
953 *Dev* 2015;**29**: 234-243.

- 954 Ceresa BP, Peterson JL. Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor. *Int Rev Cell Mol Biol* 2014;**313**: 145-178.
955
- 956 Chen J, Torcia S, Xie F, Lin CJ, Cakmak H, Franciosi F, Horner K, Onodera C, Song JS, Cedars MI *et al*.
957 Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes. *Nat Cell Biol* 2013;**15**: 1415-1423.
958
- 959 Clarke HJ. History, origin, and function of transzonal projections: the bridges of communication between
960 the oocyte and its environment. *Anim Reprod* 2018;**15**: 215-223.
- 961 Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and
962 cytoplasmic events. *Hum Reprod Update* 2018;**24**: 245-266.
- 963 Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 2006;**20**: 715-723.
964
- 965 Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation
966 and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012;**356**: 65-73.
- 967 Coticchio G, Guglielmo MC, Albertini DF, Dal Canto M, Mignini Renzini M, De Ponti E, Fadini R.
968 Contributions of the actin cytoskeleton to the emergence of polarity during maturation in human oocytes.
969 *Mol Hum Reprod* 2014;**20**: 200-207.
- 970 Delgado JC, Hamilton T, Mendes CM, Siqueira AFP, Goissis MD, Buratini J, Assumpcao M. Bone
971 morphogenetic protein 15 supplementation enhances cumulus expansion, nuclear maturation and
972 progesterone production of in vitro-matured bovine cumulus-oocyte complexes. *Reprod Domest Anim*
973 2021.
- 974 Diaz FJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in
975 the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev Biol* 2006;**299**: 91-104.
- 976 Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is
977 required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;**383**: 531-535.
- 978 Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular
979 fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 2015;**103**: 303-316.
- 980 Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*
981 2001;**122**: 829-838.
- 982 Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *The EGF Receptor Family* 2003: 15-31.
- 983 Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of
984 bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence.
985 *Theriogenology* 2009;**71**: 836-848.
- 986 Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modina SC, Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Albertini
987 DF, Luciano AM. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-
988 mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod* 2014;**91**: 61.
- 989 Freimann S, Ben-Ami I, Dantes A, Ron-El R, Amsterdam A. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin
990 expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells. *Biochem Biophys Res Commun*
991 2004;**324**: 829-834.
- 992 Galloway SM, Grogan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH. Bmp15 mutations
993 and ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2002;**191**: 15-18.
- 994 Gilchrist RB. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the
995 development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev* 2011;**23**: 23-31.

- 996 Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and
997 oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;**14**: 159-177.
- 998 Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, Sugimura S, Smits J, Richard FJ,
999 Thompson JG. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction* 2016;**152**: R143-
1000 157.
- 1001 Granot I, Dekel N. The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins. *Trends in*
1002 *Endocrinology & Metabolism* 2002;**13**: 310-313.
- 1003 Haghighat N, Van Winkle LJ. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into
1004 mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *Journal of Experimental*
1005 *Zoology* 1990;**253**: 71-82.
- 1006 Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *The EGF Receptor Family* 2003: 03-14.
- 1007 Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12
1008 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol* 2005;**287**:
1009 249-261.
- 1010 Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the
1011 intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 2005;**11**: 143-160.
- 1012 Kawashima I, Umehara T, Noma N, Kawai T, Shitanaka M, Richards JS, Shimada M. Targeted disruption
1013 of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. *Mol Endocrinol* 2014;**28**:
1014 706-721.
- 1015 Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. Phosphorylation of connexin43 on
1016 serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 2000;**149**: 1503-1512.
- 1017 Landim-Alvarenga FC, Maziero RRD. Control of oocyte maturation. *Anim Reprod* 2014;**11**: 150-158.
- 1018 Lima PF, Ormond CM, Caixeta ES, Barros RG, Price CA, Buratini J. Effect of kit ligand on natriuretic
1019 peptide precursor C and oocyte maturation in cattle. *Reproduction* 2016;**152**: 481-489.
- 1020 Liu X, Xie F, Zamah AM, Cao B, Conti M. Multiple pathways mediate luteinizing hormone regulation of
1021 cGMP signaling in the mouse ovarian follicle. *Biol Reprod* 2014;**91**: 9.
- 1022 Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM. Large-scale chromatin remodeling in germinal
1023 vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol*
1024 *Reprod Dev* 2007;**74**: 740-749.
- 1025 Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu Rev Anim Biosci* 2016;**4**: 255-268.
- 1026 Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V. Changes in large-scale chromatin structure and function
1027 during oogenesis: a journey in company with follicular cells. *Anim Reprod Sci* 2014;**149**: 3-10.
- 1028 Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V. Gap junction-mediated communications regulate
1029 chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent
1030 mechanism(s). *Biol Reprod* 2011;**85**: 1252-1259.
- 1031 Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modina S. Developmental capability of denuded
1032 bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic
1033 adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 2005;**71**: 389-397.
- 1034 Macaulay AD, Gilbert I, Caballero J, Barreto R, Fournier E, Tossou P, Sirard MA, Clarke HJ, Khandjian
1035 EW, Richard FJ *et al.* The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. *Biol Reprod* 2014;**91**: 90.

- 1036 Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, Saadi HA, Gagne D, Sirard MA,
1037 Khandjian EW *et al.* Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation.
1038 *Biol Reprod* 2016;**94**: 16.
- 1039 Machado MF, Caixeta ES, Sudiman J, Gilchrist RB, Thompson JG, Lima PF, Price CA, Buratini J.
1040 Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve
1041 quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 2015;**84**: 390-398.
- 1042 Machado MF, Portela VM, Price CA, Costa IB, Ripamonte P, Amorim RL, Buratini J, Jr. Regulation and
1043 action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *J Endocrinol* 2009;**202**: 347-353.
- 1044 Mao J, Whitworth KM, Spate LD, Walters EM, Zhao J, Prather RS. Regulation of oocyte mitochondrial
1045 DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during in vitro maturation affects embryo
1046 development in pigs. *Theriogenology* 2012;**78**: 887-897.
- 1047 Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of
1048 meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005;**130**: 791-799.
- 1049 Meinecke B, Janas U, Podhajsky E, Meinecke-Tillmann S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine
1050 oocytes following protein synthesis inhibition. *Reproduction in Domestic Animals* 2001;**36**: 183-188.
- 1051 Meran S, Luo DD, Simpson R, Martin J, Wells A, Steadman R, Phillips AO. Hyaluronan facilitates
1052 transforming growth factor-beta1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor
1053 interaction. *J Biol Chem* 2011;**286**: 17618-17630.
- 1054 Millar JB, Russell P. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 1992;**68**:
1055 407-410.
- 1056 Noma N, Kawashima I, Fan HY, Fujita Y, Kawai T, Tomoda Y, Mihara T, Richards JS, Shimada M. LH-
1057 induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte
1058 maturation. *Mol Endocrinol* 2011;**25**: 104-116.
- 1059 Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA.
1060 Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap
1061 junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 2008;**135**: 3229-
1062 3238.
- 1063 Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action
1064 in the ovulatory follicle. *Science* 2004;**303**: 682-684.
- 1065 Pincus G, Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The
1066 Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* 1935;**62**: 665-675.
- 1067 Prochazka R, Blaha M, Nemcova L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced
1068 meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* 2012;**144**: 535-546.
- 1069 Prochazka R, Nemcova L. Mechanisms of FSH- and Amphiregulin-Induced MAP Kinase 3/1 Activation
1070 in Pig Cumulus-Oocyte Complexes During Maturation In Vitro. *Int J Mol Sci* 2019;**20**: 1-13.
- 1071 Prochazka R, Petlach M, Nagyova E, Nemcova L. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig
1072 cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro:
1073 comparison with gonadotropins. *Reproduction* 2011;**141**: 425-435.
- 1074 Richani D, Dunning KR, Thompson JG, Gilchrist RB. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus
1075 cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Hum Reprod Update* 2021;**27**: 27-
1076 47.
- 1077 Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and
1078 developmental competence. *Hum Reprod Update* 2018;**24**: 1-14.

1079 Richani D, Ritter LJ, Thompson JG, Gilchrist RB. Mode of oocyte maturation affects EGF-like peptide
1080 function and oocyte competence. *Mol Hum Reprod* 2013;**19**: 500-509.

1081 Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**234**:
1082 75-79.

1083 Rizos D, Ward F, Duffy PAT, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation,
1084 fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and
1085 blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;**61**: 234-248.

1086 Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP.
1087 Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*
1088 2004;**164**: 769-779.

1089 Sanchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1822**: 1896-1912.

1090 Santiquet N, Robert C, Richard FJ. The dynamics of connexin expression, degradation and localisation are
1091 regulated by gonadotropins during the early stages of in vitro maturation of swine oocytes. *PLoS One*
1092 2013;**8**: e68456.

1093 Shimada M. Cumulus cells are essential mediators of LH induced ovulation stimuli from granulosa cells to
1094 the oocyte. *Reproduction Abstracts* 2014.

1095 Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS. Paracrine and autocrine regulation
1096 of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for
1097 prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 2006;**20**: 1352-1365.

1098 Shimada M, Umehara T, Hoshino Y. Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation
1099 process. *Reprod Med Biol* 2016;**15**: 201-216.

1100 Shimada M, Yamashita Y. The Key Signaling Cascades in Granulosa Cells during Follicular Development
1101 and Ovulation Process. *Journal of Mammalian Ova Research* 2011;**28**: 25-31.

1102 Shuhaibar LC, Egbert JR, Edmund AB, Uliasz TF, Dickey DM, Yee SP, Potter LR, Jaffe LA.
1103 Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for
1104 rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone. *Dev Biol* 2016;**409**: 194-201.

1105 Simpson RM, Wells A, Thomas D, Stephens P, Steadman R, Phillips A. Aging fibroblasts resist phenotypic
1106 maturation because of impaired hyaluronan-dependent CD44/epidermal growth factor receptor signaling.
1107 *Am J Pathol* 2010;**176**: 1215-1228.

1108 Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with
1109 developmental competence. *Theriogenology* 2001;**55**: 1241-1254.

1110 Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*
1111 2006;**65**: 126-136.

1112 Soares ACS, Lodde V, Barros RG, Price CA, Luciano AM, Buratini J. Steroid hormones interact with
1113 natriuretic peptide C to delay nuclear maturation, to maintain oocyte-cumulus communication and to
1114 improve the quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2017;**29**: 2217-2224.

1115 Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. Amphiregulin
1116 co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence:
1117 effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod* 2014;**20**: 499-513.

1118 Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and
1119 companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol* 2005;**279**: 20-30.

1120 Sugiura K, Su YQ, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki
1121 S, Eppig JJ. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells.
1122 *Development* 2008;**134**: 2593-2603.

1123 Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining
1124 oocyte developmental competence. *Reproduction* 2010;**139**: 685-695.

1125 Tesfaye D, Ghanem N, Carter F, Fair T, Sirard MA, Hoelker M, Schellander K, Lonergan P. Gene
1126 expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in
1127 vitro. *Reprod Fertil Dev* 2009;**21**: 451-461.

1128 Tsafiri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJW, Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization
1129 and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective
1130 phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 1996;**178**: 393-402.

1131 Vaccari S, Weeks JL, 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the
1132 luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009;**81**: 595-604.

1133 van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation
1134 within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005;**63**: 1717-1751.

1135 Van Tol HTA, Van Eijk MJT, Mummery CL, Van Den Hurk R, Bevers MM. Influence of FSH and hCG
1136 on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana
1137 granulosa. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 1996;**45**: 218-224.

1138 Viana J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology*
1139 *Newsletter* 2020;**38**.

1140 Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental
1141 competence. *J Anim Sci* 2007;**85**: E1-3.

1142 Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes.
1143 *Reproduction* 1988;**82**: 127-134.

1144 Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell*
1145 *biology* 2001;**2**: 127-137.

1146 Yokoo M, Sato E. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *International review of*
1147 *cytology* 2004;**235**: 251-282.

1148 Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol*
1149 2014;**28**: 2-11.

1150 Zhang K, Hansen PJ, Ealy AD. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and
1151 developmental competence in vitro. *Reproduction* 2010a;**140**: 815-826.

1152 Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ. Estradiol promotes and maintains cumulus
1153 cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro.
1154 *Endocrinology* 2011;**152**: 4377-4385.

1155 Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain
1156 meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010b;**330**: 366-369.