

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeitos da adição de Neuroregulina 1 em diferentes cenários de maturação oocitária
sobre a progressão meiótica e produção embrionária**

Carolina Gabrielli de Souza

Botucatu

2022

CAROLINA GABRIELLI DE SOUZA

**Efeitos da adição de Neuroregulina 1 em diferentes cenários de maturação oocitária
sobre a progressão meiótica e produção embrionária**

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

Orientador

Prof. Dr. José Buratini Júnior

Co-orientadora

MSc. Thaisy Tino Dellaqua

Botucatu

2022

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

Souza, Carolina Gabrielli de.

Efeitos da adição de Neuroregulina 1 em diferentes cenários de maturação oocitária sobre a progressão meiótica e produção embrionária / Carolina Gabrielli de Souza. - Botucatu, 2022

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

Orientador: José Buratini

Coorientador: Thaisy Tino Dellaqua

Capes: 20602006

1. Técnicas de maturação in vitro de oócitos.
2. Neuroregulinas. 3. Hormônio foliculo-estimulante.
4. Meiose. 5. Neuroregulina-1.

Palavras-chave: Ampirregulina; FSH; Maturação in vitro; NRG1; PIVE.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional por abrirem às portas para que eu traçasse meu futuro dentro da Biomedicina, e a todos os membros do corpo docente que me inspiraram nessa jornada.

Agradeço ao meu incrível orientador Prof. Dr. José Buratini e aos membros do laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana pela parceria e imensurável ajuda durante toda a extensão do estágio. Obrigada por tornarem meu ano no laboratório uma experiência além de enriquecedora, também leve e divertida. Agradeço em especial à minha co-orientadora doutoranda Thaisy Tino Dellaqua, pela paciência em me ensinar e permitir que todos construíssemos confiança dentro da rotina, sem sua liderança e apoio o presente trabalho não teria sido concluído.

Agradeço às minhas belíssimas amizades conquistadas durante a graduação, que sempre torceram pelo meu sucesso durante todos esses cinco anos e continuam atuando como inspirações pessoais e profissionais para minha vida. Eu uso o termo “conquistadas” pois realmente creio que me aproximar de vocês foi uma das mais lindas vitórias da minha graduação, e eu carregarei esse orgulho para sempre.

Por fim, agradeço a minha família pelo inegável suporte em todas as etapas da minha trajetória e por sempre acreditarem no meu potencial quando eu mesma muitas vezes não sou capaz. É simplesmente impagável poder contar com uma rede de apoio tão linda e inspiradora como a que eu tenho com vocês, e toda e qualquer conquista que obtive só foi possível por conta deste amor. Espero que meu crescimento e minhas felicidades estejam sempre acompanhados de suas presenças, pois é o que realmente importa.

RESUMO

A maturação oocitária *in vitro* (MIV) representa uma técnica importante no campo da reprodução assistida, e há grande interesse em melhorar sua eficiência em animais e humanos. Assim, fatores intrafoliculares estão sendo explorados como potenciais aditivos para o sistema *in vitro*. Objetivou-se avaliar os efeitos da neuroregulina 1 (NRG1), um EGF-like que modula vias induzidas pelo receptor de EGF durante a maturação oocitária de oócitos bovinos submetidos à MIV induzida com ampirregulina/AREG (meio mais fisiológico - SF) ou FSH (meio convencional). Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram aspirados de ovários provenientes de abatedouro e submetidos à MIV com os respectivos tratamentos: FSH, FSH+N (1 ng/mL de NRG1), SF e SF+N, para avaliação de sua influência sobre dois parâmetros: a progressão meiótica e a produção embrionária. Para o experimento 1, a maturação foi avaliada durante 6 e 22 horas. Todos os oócitos foram desnudos, corados e avaliados quanto a conformação do material genético. No experimento 2, a maturação foi realizada por 24 horas, em seguida, os COCs foram submetidos a fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Ao final de 7 dias de cultivo, a taxa e a classificação de embriões foram avaliadas e a contagem de células embrionárias totais foi realizada. Os dados obtidos de 5 réplicas biológicas foram transformados em arco-seno, comparados com teste T de Student e as diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Quanto à progressão meiótica, a adição de NRG1 atrasou a retomada da meiose nos dois cenários avaliados: MIV induzida com AREG e a induzida com FSH, uma vez que porcentagem de oócitos em quebra da vesícula germinativa (GVBD) diminuiu após 6 horas de cultivo. Além disso, a NRG1 não alterou a dinâmica meiótica após 22 horas de MIV em ambos os cenários e não modificou as taxas de expansão do *cumulus*. Quanto à produção embrionária, a adição de NRG1 não alterou a porcentagem de clivagem dos zigotos em ambos os meios e não foi observada uma diferença na taxa de blastocistos ou uma alteração na qualidade dos embriões produzidos. Conclui-se que o presente estudo fornece evidências de que a NRG1 está envolvida nos mecanismos que coordenam a retomada meiótica em oócitos bovinos, apresentando um grande potencial para melhorar da eficiência dos protocolos convencionais e/ou fisiológicos de MIV. Entretanto, mais investigações acerca de sua atuação durante a produção *in vitro* de embriões (PIVE) são necessárias para confirmar seu potencial na qualidade e desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: NRG1, maturação *in vitro*, PIVE, FSH, ampirregulina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Delineamento Experimental.....	12
3.1.1 Experimento 1.....	13
3.1.2 Experimento 2.....	13
3.2 Obtenção dos complexos <i>cumulus</i> -oócito (<i>COCs post mortem</i>).....	13
3.3 Maturação oocitária <i>in vitro</i> (MIV).....	14
3.4 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	14
3.5 Análise da progressão meiótica.....	14
3.6 Análise estatística.....	15
4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO.....	18
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, 45.952 ciclos de fertilização *in vitro* foram realizados em 2021, com 114.372 embriões congelados e cerca de 36 mil gestações clínicas obtidas através de técnicas de reprodução assistida entre 2020 e 2021 (14º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões – SisEmbrio). O SisEmbrio foi criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com o objetivo de reunir e divulgar informações sobre a produção e qualidade dos Centros de Reprodução Humana Assistida, mostrando o aumento progressivo das técnicas de reprodução em território nacional e seu decorrente impacto nas taxas de natalidade.

É notável que desde o nascimento de Louisa Brown em 1978, a primeira fertilização *in vitro* de sucesso, as técnicas de reprodução assistida se tornaram progressivamente uma parte integral da medicina moderna; e seu impacto global na sociedade e na demografia é evidente, com um avanço tecnológico impressionantemente rápido (Chronopoulou and Harper, 2014; De Geyter, 2019). As tecnologias de reprodução assistida (do inglês *Assisted Reproductive Technologies* - ART) englobam todas as intervenções *in vitro* relacionadas à manipulação de oócitos, espermatozoides e embriões com o propósito de reprodução (De Geyter, 2019). Entre essas intervenções, temos a fertilização *in vitro* clássica (FIV), convencionalmente executada em clínicas humanas a partir de estimulação ovariana por gonadotrofinas, agonistas e/ou antagonistas de GnRH, de modo a evitar uma ovulação antecipada e gerar uma grande quantidade de folículos ovarianos (von Wolff, 2019), os quais serão puncionados para aspiração dos gametas, selecionados e posteriormente unidos em placa para FIV no laboratório. Os embriões gerados são transferidos para a paciente em estágios de blastocisto cultivados normalmente por 5 ou 6 dias (D5 ou D6), onde assim já apresentam potencial de continuar se desenvolvendo, boa viabilidade e normalidade cromossômica (Neblett *et al.*, 2021).

Outra técnica de reprodução assistida notável é a maturação oocitária *in vitro* (MIV). A maturação oocitária *in vivo* abrange os eventos fisiológicos que antecedem e dão base para uma fertilização e desenvolvimento embrionário de sucesso, acompanhando a progressão citoplasmática bem como a retomada meiótica do oócito. Nesse período, diversas organelas, principalmente os grânulos corticais, são redistribuídos no citoplasma em preparação para fertilização; e no núcleo, o oócito antes estagnado desde a vida fetal em profase I (chamado de estado de vesícula germinativa em protocolos animais) passa à metáfase II por sinalizações

pré-ovulatórias, onde tal processo será concluído somente após a penetração do espermatozoide (Lonergan and Fair, 2016). Nesse sentido, a técnica laboratorial de MIV consiste na coleta de complexos *cumulus*-oócito (do inglês *cumulus*-oocyte complexes - COCs) em seus estados imaturos de vesícula germinativa provenientes de ovários não estimulados ou minimamente estimulados, para posteriormente passarem por um processo de maturação *in vitro* e subsequente fertilização. Sua aplicação mais comum se dá na produção global de espécies da pecuária, como em suínos, ovinos, caprinos e amplamente em bovinos, tanto em rebanhos leiteiros como de corte (Gilchrist *et al.*, 2016).

Em humanos, a MIV ainda é mais limitada do que na pecuária por apresentar uma menor eficácia de geração de gravidez do que outras técnicas convencionais, em grande decorrência pela utilização de meios incompatíveis com a fisiologia ovariana, e não por razões relacionadas a segurança do procedimento ou pelas tecnologias envolvidas (Gilchrist *et al.*, 2016; Buratini *et al.*, 2021). Porém, ainda assim, a técnica se mostra interessante para alguns casos patológicos, como a preservação de fertilidade de mulheres que passam por tratamentos de câncer e para mulheres com síndrome do ovário policístico, as quais podem desenvolver síndrome do ovário superestimulado a partir dos tratamentos convencionais de FIV (Gilchrist *et al.*, 2016; Lonergan and Fair, 2016; Buratini *et al.*, 2021). No geral, o propósito da MIV é que o oócito cultivado adquira capacidade e qualidade intrínseca para se desenvolver até a ativação do genoma embrionário após a fertilização, sendo uma etapa fundamental na otimização da produção *in vitro* de embriões (PIVE) de muitas espécies (Pioltine *et al.*, 2021).

De fato, a qualidade oocitária se mostra um fator limitante para a fertilização *in vitro*. Por mais que as técnicas de MIV seguramente representem uma etapa importante na produção de embriões pré-FIV, após a remoção dos COCs do ambiente folicular inicia-se uma retomada espontânea da meiose, o que eventualmente pode comprometer a qualidade oocitária, já que a precipitação de sua maturação nuclear pode causar uma assincronia entre o núcleo e o citoplasma do gameta, sendo assim prejudicial para sua competência final (Gilchrist, 2011). Dessa forma, reforça-se a utilização de um meio de cultivo mais fisiológico do que os meios convencionais, contendo agentes que sustentem a sinalização de maturação *in vitro* e a sincronia entre os processos dentro da cascata ovulatória. *In vivo*, o pico de hormônio luteinizante (LH) estimula a ovulação e a luteinização dos folículos pré-ovulatórios (Richards *et al.*, 1998), promovendo a expansão das células do *cumulus* (CCs), maturação oocitária e ruptura folicular (Richards *et al.*, 2002; Noma *et al.*, 2011). A resposta direta ao pico de LH é

predominante nas células da granulosa (GCs) devido à presença de maiores níveis de receptores nestas estruturas (Lawrence *et al.*, 1980; Russell and Robker, 2007);

Atualmente, os protocolos de MIV vigentes em animais são baseados no uso do hormônio folículo estimulante (FSH) como indutor da maturação oocitária *in vitro* a partir do aumento da expressão e produção de fatores de crescimento epidermais (EGFs) diretamente nas CCs (Freimann *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2013). A família dos EGFs é composta pelo EGF e os EGF-like, que são classificados em sete tipos de peptídeos: fator de crescimento transformador α (TGF- α), fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina (HB-EGF), mitógeno epitelial (EPIGEN), ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC) e as neuregulinas de 1 a 4 (NRG 1-4), todos com propriedades estruturais e funcionais muito semelhantes (Harris *et al.*, 2003; Schneider and Wolf, 2009; Richani and Gilchrist, 2017). Em mamíferos, o LH age estimulando a expressão dos peptídeos EGF-like através de receptores presentes nas células da granulosa, entretanto, não estimula diretamente as células do *cumulus*, já que estas não possuem receptores para tal hormônio e, portanto, dependem de indutores para produção dos peptídeos (Richani *et al.*, 2013).

Estudos anteriores identificaram os peptídeos AREG, EREG e BTC como mediadores parácrinos do sinal de LH no folículo pré-ovulatório, estimulando a expansão das CCs e a retomada da meiose (Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2006). Todos estes peptídeos se ligam com diferentes especificidades e ativam quatro receptores da família dos receptores de EGF (EGFR), também conhecidos como ErbB ou HER (Conti *et al.*, 2006). A ligação dos EGF e EGF-like aos seus receptores ativa tirosinas quinases, causando a fosforilação dos EGFRs, o que promove a ativação de vias de sinalização subsequentes e diferentes respostas, como regulação da expressão gênica, proliferação celular e ativação da MAPK e ERKs (Carpenter and Cohen, 1990; Harris *et al.*, 2003; Conti *et al.*, 2006; Zeng and Harris, 2014), vias presentes na cascata ovulatória (Gilchrist *et al.*, 2008). Richani *et al.* (2013) mostraram que peptídeos EGF-like são componentes importantes a serem adotados em sistemas de MIV por estimularem o desenvolvimento embrionário melhor do que os componentes usuais FSH ou EGF, uma vez que, durante o cultivo, estes últimos não mantêm os níveis de ativação de EGFR vistos *in vivo* (Richani *et al.*, 2013).

Como citado, as neurorregulinas constituem uma família grande de moléculas sinalizadoras EGF-like envolvidas na comunicação entre células, possuindo 4 membros: *NRG1*, *NRG1*, *NRG3* e *NRG4*, sendo a *NRG1* a mais investigada (Britsch, 2007). A

neuroregulina 1 (NRG1) é alvo de estudo em diferentes áreas da ciência, relacionada com doenças cardiovasculares, malária e câncer, por apresentar diferentes isoformas que diferem na expressão específica nos tecidos e atividade biológica, contribuindo para uma diversidade de funções *in vivo* (Britsch, 2007; Banerjee *et al.*, 2022). Nesse sentido, ela também é expressa e secretada pelas GCs em folículos pré-ovulatórios, onde age de forma a modular a velocidade da ativação da cascata ovulatória pelos EGF-*like* via ERK1/2 (Falls, 2003; Noma *et al.*, 2011; Shimada and Yamashita, 2011); e reduzir os níveis de Ca⁺² nas CCs, resultando na diminuição da atividade de PKC para um nível fisiológico, o que retarda o tempo de maturação meiótica dos oócitos para ajustar o tempo de ovulação (Shimada *et al.*, 2016).

Ademais, estudos recentes mostram sua atuação na regulação da expressão e secreção de citocinas e quimiocinas nas células da granulosa, de modo a sustentar o tecido folicular e atuar na resolução de inflamações, evitando a maturação folicular descontrolada ou a atresia (Banerjee *et al.*, 2022). Assim, a NRG1 pode afetar eventos na ovulação e/ou maturação do oócito, uma vez que pode atrasar a retomada espontânea da meiose em complexos *cumulus*-oócito (COCs) isolados de folículos pré-ovulatórios sem tratamentos hormonais e pode melhorar a competência oocitária durante a FIV (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014). Diversos estudos já comprovaram tal atuação da proteína na maturação oocitária em diferentes modelos animais, como em camundongos (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014) e porcos (Mao *et al.*, 2012), todos revelando o efeito da NRG1 sobre a obtenção de viabilidade e competência oocitária. Estes relatos mostram que a NRG1 tem um papel importante durante o processo de maturação dos COCs, porém, seu efeito na MIV de COCs bovinos ainda é pouco elucidado.

O modelo animal bovino, além de ser uma importante plataforma para tecnologias de reprodução artificial na agropecuária, prova-se como um dos mais valiosos para investigações dos eventos reprodutivos em humanos, mostrando-se interessante para estudos translacionais pelas semelhanças de dinâmica folicular ovariana e controle endócrino entre as duas espécies (Beker van Woudenberg *et al.*, 2012). Como visto em mulheres, a maioria dos intervalos interovulatórios em fêmeas bovinas são compostos por dois ou três estágios de desenvolvimento folicular; além disso, há grande similaridade entre ambas quanto aos mecanismos reguladores da emergência de onda folicular e seleção do folículo dominante e ovulação (Malhi *et al.*, 2007). Ademais, análises filogenéticas de proteínas envolvidas com o desenvolvimento embrionário também mostram que, mesmo com a conservação de linhas de desenvolvimento durante a evolução, oócitos humanos são mais próximos aos de fêmeas

bovinas do que aqueles encontrados em camundongos, um modelo experimental frequentemente utilizado na pesquisa (Santos *et al.*, 2014). Portanto, em vista das abundantes similaridades, tal modelo mostra-se de grande interesse para futuros estudos translacionais quanto à maturação oocitária e fertilização *in vitro*.

Como citado, o FSH é amplamente utilizado em diversos protocolos de 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.*, 2013). A ação desse hormônio é mediada através de segundos mensageiros, como AMPc, proteína quinase A (PKA) e/ou proteína quinase C (PKC; Sirard *et al.*, 2007). O FSH induz a maturação oocitária a partir da ligação com seus receptores nas CCs (FSHR), o que eleva os níveis de AMPc nestas células e ativa dois tipos de PKA (I e II). A ativação do tipo I mantém os oócitos estagnados em fase de prófase I da divisão meiótica, enquanto que a ativação do tipo II estimula os eventos transcricionais distais que resultam na indução do rompimento da vesícula germinativa (Farin *et al.*, 2007). Além disso, estudos mostraram que o FSH induz a retomada da meiose em oócitos bovinos via expressão de peptídeos e ativação da PKC, através do estímulo para hidrólise de 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP2) por fosfolipase C (PLC) e consequente ativação de PKC e mobilização de cálcio intracelular (Sirard *et al.*, 2007). A ativação da via PKC atua diretamente na fosforilação das conexinas presentes nas junções do tipo GAP (GJ) entre as CCs e o oócito, causando seu fechamento (Shimada *et al.*, 2016). As GJ exercem um papel crítico nos COCs, transmitindo sinais que regulam a retomada da meiose e aquisição de competência oocitária (Farin *et al.*, 2007). Estudos mostraram que 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).

Diante disso, nosso laboratório em colaboração com o Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão, 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 sintonia 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 e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). A adição de substâncias promotoras de crescimento aos meios de maturação e a simulação das condições intrafoliculares já é uma tendência entre as pesquisas modernas em MIV/PIVE, em busca de aumentar a eficiência do desenvolvimento *in vitro* dos oócitos (Araujo, 2015). 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). Além disso, 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). No entanto, quando a fase MIV (com AREG) deste cultivo é utilizada isoladamente, a maturação oocitária pode ser precipitada. Assim, estudar as interações entre FSH-NRG1 e AREG-NRG1 em modelo bovino pode ser fundamental para melhorar os processos que fazem parte da maturação oocitária e produção embrionária *in vitro*.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da NRG1 durante a MIV com diferentes meios de cultivo (FSH – convencional e SF – fisiológico) sobre a progressão meiótica de oócitos maturados *in vitro* e, em paralelo, investigar o efeito da NRG1 sobre a produção embrionária a partir de COCs bovinos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Os efeitos da adição de NRG1 aos meios MIV (FSH e SF) acima escritas foram analisados em ao menos 5 réplicas experimentais, em que os tratamentos foram testados em grupos de 20 COCs cultivados em 400 µL de meio. O meio de maturação base para todos os experimentos foi composto de TCM 199 com bicarbonato suplementado com piruvato (22 µL/mL), amicacina (75 µg/mL) e albumina sérica bovina (BSA, 4 mg/mL); acrescido de r-hFSH (0,1 UI/mL) para os grupos FSH, ou acrescido de r-hFSH (0,01 UI/mL), AREG (100 ng/mL), IGF-1 (10 ng/mL), 17β-oestradiol (50 ng/mL) e progesterona (150 ng/mL) para os grupos SF (Sistema Folicular).

3.1.1 Experimento 1: *Avaliação do efeito de NRG1 durante a maturação in vitro sobre a progressão meiótica*

COCs bovinos foram cultivados em grupos (20 COCs/grupo) conforme descrito abaixo, durante 6 e 22 horas, em meio convencional de FSH ou em meio MIV do Sistema Folicular, na presença de 1ng/ml NRG1 ou não. Ao final de cada tempo de cultivo, os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst para análise da progressão meiótica.

Grupos: FSH; FSH + NRG1; SF; SF + NRG1

3.1.2 Experimento 2: *Avaliação do efeito de NRG1 durante a maturação in vitro sobre a produção e qualidade embrionária*

COCs bovinos foram cultivados em grupos (20 COCs/grupo) conforme descrito abaixo, durante 24 horas, em meio convencional de FSH ou em meio MIV do Sistema Folicular, na presença de 1ng/ml NRG1 ou não. Após a MIV, os COCs maduros foram submetidos a FIV e CIV. Ao final de 7 dias de cultivo, a taxa de embriões foi avaliada e a coloração com Hoechst foi realizada para contagem de células embrionárias totais.

Grupos: FSH; FSH + NRG1; SF; SF + NRG1

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

Os COCs imaturos foram coletados de ovários bovinos obtidos do abatedouro local. Os ovários foram conduzidos ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) aquecida à 36°C e utilizados imediatamente. Após higienização dos mesmos, a aspiração dos folículos com diâmetro de 3 a 8 mm foi realizada com o uso de seringa de 10 mL e agulha 19G. O fluido folicular obtido foi depositado em tubos cônicos estéreis aquecidos em banho seco à 37°C até a formação de um pellet. Após sedimentação no líquido folicular, os COCs foram recuperados e classificados como: grau I, II ou III de acordo com suas características celulares (Khurana and Niemann, 2000). Somente COCs com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de CCs compactas foram utilizados (grau I e II). Posteriormente, foram transferidos para a placa de maturação previamente montada.

3.3 Maturação oocitária *in vitro* (MIV):

Após a lavagem em meio HEPES, os grupos foram transferidos para a placa de maturação *in vitro*. As placas de maturação foram previamente montadas em placas de 4 poços (NUNC®) com 400 µL de meio de cultivo e após a transferência dos COCs, foram colocadas em estufa por um período de 24 horas à temperatura de 38,5°C e umidade saturada do ar com 5% de CO₂. Os tratamentos foram adicionados ao meio base de maturação.

3.4 Fecundação *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV):

A FIV foi realizada de acordo com Soares *et al.* (2017), com pequenas alterações. Os espermatozoides criopreservados foram separados em 45% - 90% de gradiente de Select Sperm® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), contados e adicionados em cada poço com a concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL. COCs e espermatozoides foram incubados em meio FIV (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) durante 18h a 38.5°C em 5% de CO₂ em ar umidificado. Após a FIV, os prováveis zigotos foram lavados e as CCs removidas por agitação em vórtex e foram transferidos para meio de cultivo embrionário CIV (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) enriquecido com 2,5% de SFB. O cultivo foi realizado em incubadora com mistura gasosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ a 38.5°C em ar umidificado, durante 7 dias completos. Ao final do período de cultura (D8), a taxa de blastocistos foi avaliada sob um microscópio estereoscópico, e os blastocistos foram morfológicamente classificados como não expandidos, expandidos e eclodidos (Jakobsen *et al.*, 2006). Posteriormente, os embriões foram fixados em metanol 60% e os núcleos celulares foram contados sob um microscópio de fluorescência após coloração com Hoechst 33342.

3.5 Análise da progressão meiótica

Os oócitos foram submetidos a sucessivas pipetagens para causar um turbilhamento e remoção das CCs circundantes. Em seguida, os oócitos desnudos foram fixados em metanol 60% e corados com Hoeschst 33342 para avaliação da progressão meiótica. As lâminas foram visualizadas em microscópio com epifluorescência e o material genético foi classificado em vesícula germinativa (GV), quebra de vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase-telófase (ANA-TEL), metáfase II (MII) e degenerados (DEG).

3.6 Análise Estatística

Os efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros descritos acima foram analisados por meio do software JMP (SAS Institute). Para isto, o teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk) e de homogeneidade de variâncias entre os grupos com transformação de dados (logaritmo ou arc-seno), quando necessário, foram realizados para realização de análise paramétrica ou não paramétrica. Assim, os efeitos foram testados por T-Student ou Wilcoxon. Os resultados estão apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Em relação ao efeito da NRG1 durante a maturação *in vitro* sobre a progressão meiótica, a adição da proteína ao meio de cultivo diminuiu a porcentagem de COCs que atingiram a GVBD às 6h de MIV, tanto no meio com FSH quanto com SF (Figura 1a). Em contrapartida, a NRG1 não causou alterações na progressão meiótica após 22 horas de cultivo em ambos os tratamentos (Figura 1b).

A adição da proteína não alterou a expansão das células do *cumulus* dos oócitos maturados (Figura 2a) e também não resultou em uma diferença significativa no índice de clivagem embrionária (Figura 2b). Assim, a neuroregulina manteve semelhante a produção de embriões em comparação aos grupos controles (Figura 2c) bem como a porcentagem de blastocistos expandidos e eclodidos (Figura 2d e Figura 2e). Por fim, não foi observada uma diferença no número total de células embrionárias entre os grupos tratados com a proteína e os respectivos controles (Figura 2f).

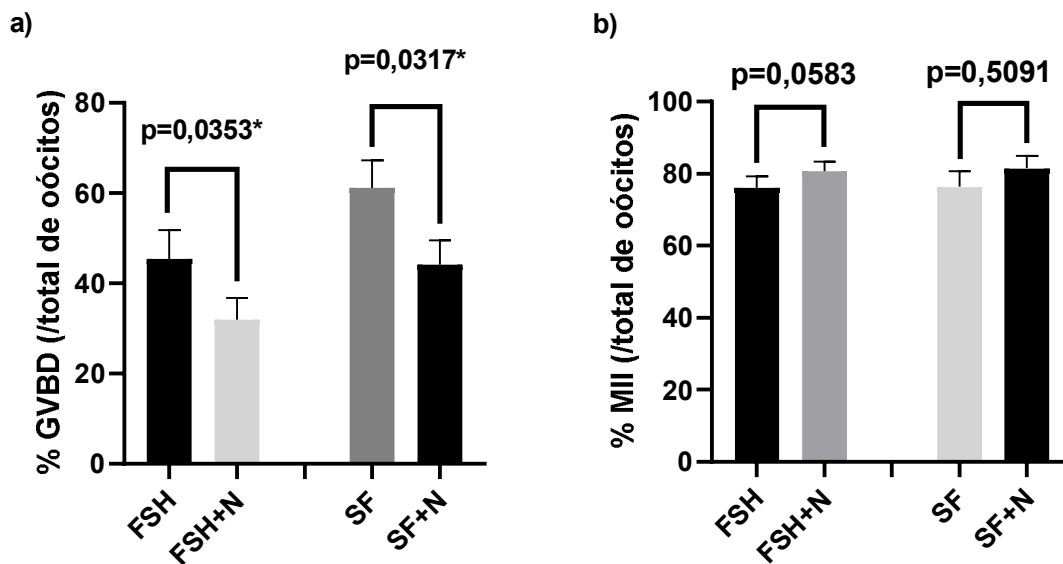


Figura 1. Efeitos da NRG1 associada ao meio de maturação *in vitro* com FSH ou SF sobre a maturação meiótica. **a)** As barras mostram a porcentagem de COCs que atingiram GVBD após 6 horas de cultivo ($P < 0,05$). **b)** As barras mostram a porcentagem de COCs que atingiram a metáfase II após 22 horas de cultivo ($P > 0,05$). Os resultados estão apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com $p \leq 0,05$.

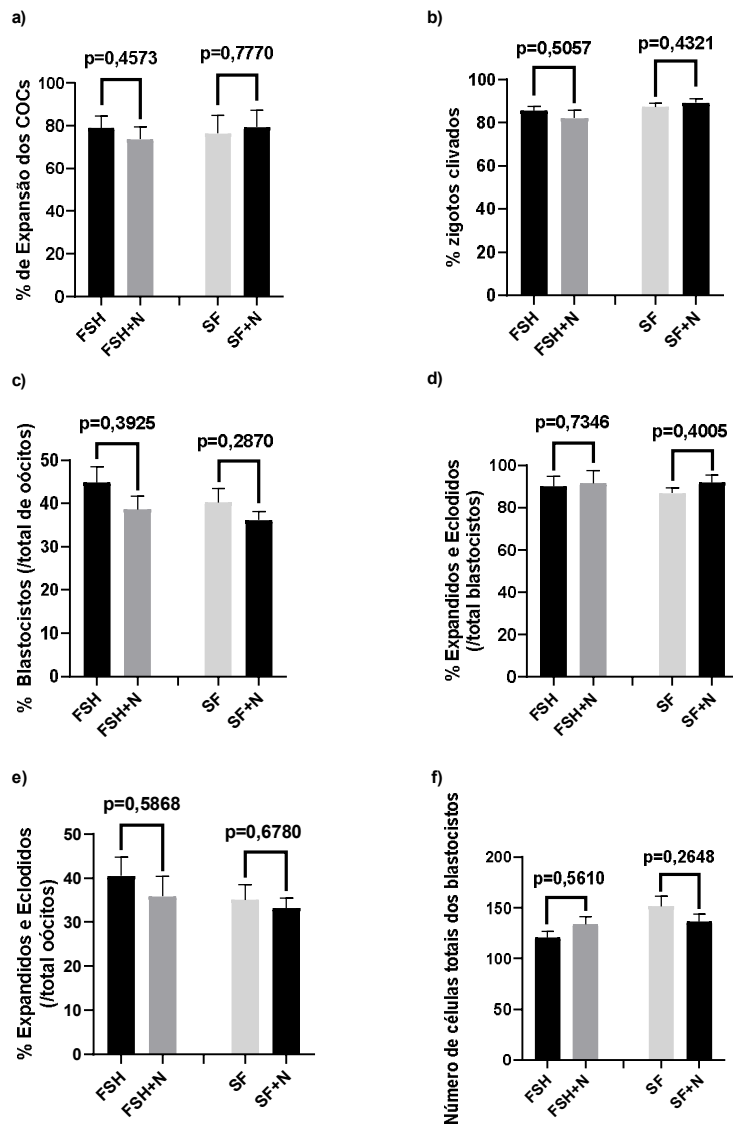


Figura 2. Efeitos da NRG1 associada ao meio de maturação *in vitro* com FSH ou SF sobre a produção embrionária. **a)** As barras mostram a porcentagem de COCs que atingiram completa ou quase completa expansão, calculada em relação ao total de oócitos cultivados ($P > 0,05$). **b)** As barras mostram a porcentagem de zigotos classificados como clivados, calculada em relação ao total de oócitos cultivados ($P > 0,05$). **c)** As barras mostram a porcentagem total de blastocistos produzidos calculados em relação ao total de oócitos cultivados ($P > 0,05$). **d)** As barras mostram a porcentagem de blastocistos expandidos e eclodidos calculados em relação ao total de blastocistos gerados ($P > 0,05$). **e)** As barras mostram a porcentagem de blastocistos expandidos e eclodidos calculados em relação ao total de oócitos cultivados ($P > 0,05$). **f)** As barras mostram a média do número de células contadas por blastocisto através de microscopia por fluorescência ($P > 0,05$). Os resultados estão apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A maturação oocitária é um processo complexo e vital que envolve a maturação nuclear e citoplasmática do gameta para que esse atinja competência total, e a assincronia entre essa dinâmica se mostra um dos grandes fatores para a baixa produção de embriões *in vitro* (Landim-Alvarenga and Maziero, 2014; He *et al.*, 2021). Portanto, estudar a maturação oocitária e seus processos é fundamental para o desenvolvimento de metodologias para melhorar o sucesso de produção embrionária *in vitro* (Landim-Alvarenga and Maziero, 2014). Estudos prévios comprovam a secreção de neuroregulina 1 nas células da granulosa e sua posterior ação nestas células e no complexo *cumulus*-oócito (COCs) (Shimada *et al.*, 2016), exercendo um importante papel regulador ao reduzir a ativação de PKC nas células do *cumulus* e retardar o fechamento das junções GAP, o que previne a progressão meiótica prematura (Kawashima *et al.*, 2014).

O presente estudo teve como objetivo investigar a fundo a atuação da NRG1 sobre a maturação oocitária em diferentes cenários, no âmbito de progressão meiótica e na qualidade e taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos. Para isso, dois meios de cultivo foram utilizados: o meio convencional de FSH e um meio mais fisiológico denominado Sistema Folicular (SF). Já é bem elucidado na literatura a importância da escolha do meio de cultivo em experimentos bovinos *in vitro*, tendo em vista que tal ambiente pode influenciar a morfologia e a expressão genética do embrião e posteriormente seu desenvolvimento fetal e placentar (Farin *et al.*, 2001). Como já citado, o meio de cultivo com FSH é um meio convencional comumente utilizado para experimentos relacionados a MIV e PIVE (Pandey *et al.*, 2010), pela atuação deste em estimular a expressão de AREG e EREG em células do *cumulus* após cultivo, auxiliando na maturação do oócito e em sua qualidade (Freimann *et al.*, 2004). O meio de cultivo intitulado “sistema folicular” desenvolvido pelo laboratório, por sua vez, busca promover a maturação oocitária a partir da mimetização do folículo pré-ovulatório por adição de agentes fisiológicos como AREG e IGF-1 juntos de baixa dosagem de FSH, tendo em vista o papel destes na obtenção de competência oocitária através da atuação nas células do *cumulus* para produção de energia por glicólise e aceleração do processo de maturação nuclear (Sugimura *et al.*, 2014; Araujo, 2015). Dessa forma, torna-se interessante a utilização de ambos os meios para sustentação da maturação oocitária e investigação do potencial da NRG1 como moduladora deste processo.

A partir dos nossos resultados, observamos que a NRG1 atrasou a quebra da vesícula germinativa às 6 horas de cultivo, tanto no meio de maturação induzido com FSH quanto no meio induzido com AREG (SF), e não causou alterações na dinâmica de progressão meiótica para MII após 22 horas de MIV. Isto corrobora a hipótese inicial de influência da proteína no processo de competência oocitária (Falls, 2003; Noma *et al.*, 2011; Shimada and Yamashita, 2011), baseada na atuação da NRG1 em reduzir o Ca^{2+} intracelular induzido por AREG e a atividade de PKC nos COCs (Kawashima *et al.*, 2014; Shimada *et al.*, 2016). Taxas moderadas de cálcio e balanceada atividade de PKC nas células do *cumulus* são fatores necessários para uma progressão meiótica de sucesso (Kawashima *et al.*, 2014). Shimada *et al.* (2016) sugeriram que a NRG1 exerce esse papel de equilíbrio através do bloqueio da fosforilação da conexina-43 (Ser368), uma proteína responsável por causar o fechamento das junções GAP entre as células do *cumulus* e o oócito, e a qual naturalmente tem sua fosforilação induzida por PKC. Quando livre, a fosforilação da conexina-43 promove uma redução da comunicação entre o *cumulus* e o oócito, o que resulta em uma perda dos efeitos inibitórios de cAMP e cGMP foliculares sobre a fosfodiesterase 3 (PDE3) e, subsequentemente, sobre os fatores de promoção de maturação (MPF), resultando assim em uma retomada da meiose (Gilchrist, 2011). Uma ativação prematura da cascata de PKC pode resultar em uma progressão desbalanceada da ovulação, e a NRG1, ao reduzir sua atividade a um nível fisiológico e bloquear seus alvos de ação, realiza assim um papel modulador, que ajusta o tempo de maturação oocitária com o rompimento folicular (Shimada *et al.*, 2016). Tendo em vista que essa cascata de sinalização do PKC é um dos fatores para a quebra da vesícula germinativa, os resultados de taxa de GVBD vistos com FSH e SF tratados são condizentes com os dados da literatura, afirmando o papel da NRG1 na maturação nuclear do oócito. Além disso, estudos iniciais *in vitro* mostraram que a adição da dose de 1 ng/ml de NRG1 durante a MIV induzida com AREG (SF) foi suficiente para reduzir a retomada da meiose em oócitos bovinos, além de alterar a expressão de genes relacionados com a maturação oocitária, como a redução de *EGFR*, envolvido na sinalização da cascata ovulatória, e aumento de *NPR2*, relacionado a manutenção da parada meiótica (Dellaqua *et al.*, 2023), corroborando a hipótese de atuação da proteína no processo de maturação.

Como elucidado, uma progressão meiótica normal dos oócitos é essencial para uma fertilização bem sucedida e um desenvolvimento embrionário apropriado (Kawashima *et al.*, 2014). No presente estudo, a NRG1 não influenciou a dinâmica de expansão do *cumulus* ou de produção e qualidade embrionária *in vitro*, não apresentando efeitos significativos na taxa

de blastocistos gerada entre as réplicas. Tais resultados não são compatíveis com os observados em projetos anteriores executados em nosso laboratório (Dellaqua *et al.*, 2023), onde a adição da NRG1 se mostrou efetiva na PIVE, levando ao questionamento da atividade biológica da proteína utilizada no projeto em questão. Em decorrência das problemáticas geradas pela pandemia de COVID-19 e seu subsequente efeito na disponibilidade e produção dos abatedouros locais, nossos experimentos foram prejudicados, sendo necessário a prorrogação de prazo para o término. Desta forma, acredita-se que a atividade biológica da NRG1 pode ter sido alterada, uma vez que a mesma apresenta um curto período de validade e difícil aquisição, comprometendo assim a segunda parte do presente trabalho e tornando tais achados questionáveis. Na literatura, é evidente a atuação da NRG1 no processo de produção de embriões em espécies multiovulatórias. Em um estudo realizado por Kawashima *et al.* (2014), oócitos recuperados de ratos *knock-out* para o gene de NRG1 exibiram redução severa de fertilidade e competência de desenvolvimento embrionário, reportando assim o papel crucial da NRG1 no controle da progressão dos eventos oocitários, como meiose, aquisição de atividade citostática e consecutivamente o sucesso da penetração espermática. A atuação dos fatores de crescimento EGF-like na indução de expansão das células do *cumulus* também já é bem elucidada, onde a conexão com receptores ERBB1 presentes nas células da granulosa e do *cumulus* levam a ativação das cascatas como RAS e ERK1/2, críticas para a expansão de COCs e a subsequente maturação oocitária (Noma *et al.*, 2011). Em ratos, Noma *et al.* (2011) mostraram como a neuroregulina 1 mostra-se atuar em combinação com AREG em meio de cultivo ao expressar genes como o *Tnfrsf25* envolvidos na expansão, evidenciando o potencial papel da NRG1 neste processo. Diferente destes trabalhos, nosso laboratório é o primeiro a aplicar a NRG1 na MIV de oócitos bovinos e investigar seus efeitos na qualidade e produção embrionária desta espécie monovulatória.

A redistribuição mitocondrial e os níveis de produção de ATP também são fatores cruciais para a capacitação oocitária, fertilização, sucessiva implantação e desenvolvimento embrionário, tendo em vista que a atividade metabólica é um fator determinante para o desenvolvimento de potenciais embriões (Freistedt *et al.*, 2001). Da ovulação até o estágio de mórula, o embrião depende do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial para fornecer a maior parte da demanda de ATP para seu desenvolvimento (Mao *et al.*, 2012). A reorganização mitocondrial e os níveis de ATP diferem entre oócitos morfológicamente bons e ruins, podendo implicar em diferentes capacidades de desenvolvimento após a FIV (Freistedt *et al.*, 2001). Embora não observamos diferenças entre os tratamentos durante a

clivagem embrionária (D3), a NRG1 já se mostrou atuar na atividade mitocondrial dos oócitos, auxiliando no desenvolvimento embrionário inicial (Mao *et al.*, 2012). Em um estudo realizado com modelos suínos, o tratamento com NRG1 durante a MIV aumentou as cópias de DNA materno em oócitos, sendo que tal resultado apresentou uma associação linear positiva com a PIVE, demonstrada pela maior taxa de blastocistos formados no grupo tratado quando comparado ao controle (Mao *et al.*, 2012). Tais achados evidenciam o potencial da neuroregulina em promover a sincronização da maturação nuclear e citoplasmática e, a partir disso, promover efetivamente o desenvolvimento embrionário.

Na literatura, também já é bem estabelecido o papel determinante da quantidade de células da massa celular interna e trofotoderma do embrião para a qualidade embrionária final (Sugimura *et al.*, 2012). Em um estudo organizado por Jakobsen *et al.* (2006), foi constatado que blastocistos classificados como morfológicamente normais e de boa qualidade apresentaram maior número de células na contagem e se desenvolveram mais rapidamente do que embriões classificados como morfológicamente inferiores. Tais constatações também são apoiadas por estudos mais antigos (Farin *et al.*, 1997; Farin *et al.*, 2001), ressaltando assim a grande importância do parâmetro de número de células para a dinâmica de desenvolvimento embrionário. Em clínicas de reprodução humana, as características de número de células, simetria celular e fragmentação são de extrema importância para a seleção de embriões a serem transferidos, sendo o número de células um dos indicadores mais importantes de potencial de desenvolvimento, já que pode refletir diretamente na habilidade do embrião de progressão do ciclo celular (Kong *et al.*, 2016). Tais avaliações são realizadas por uma incubadora *time lapse* durante o cultivo em clínicas modernas, através de câmaras acopladas ao equipamento que capturam imagens de alta resolução e monitoram a constante divisão do embrião, dados que posteriormente são analisados por algoritmos para asseguramento de desenvolvimento normal (Kirkegaard *et al.*, 2012; Milewski *et al.*, 2015). Estudos realizados com incubadoras *time lapse* demonstraram que as baixas taxas de implantação pós-FIV podem ser justificadas pela seleção de embriões com proliferação anormal durante o cultivo, demonstrando a importância do acompanhamento minucioso da progressão celular nos estágios iniciais de clivagem e expansão (Hlinka *et al.*, 2012). Em um estudo de Kong *et al.* (2016) realizado com o monitoramento *time lapse*, a análise do número de células embrionárias auxiliou na seleção de embriões de melhor desenvolvimento, contribuindo para altas taxas de implantação e de nascimento. No presente estudo, a utilização da proteína não provocou um aumento no número de células nos embriões. Tal resultado não está de acordo

com experimentos anteriores no laboratório, onde a adição de NRG1 ao meio induzido com AREG (SF) aumentou a quantidade de células totais dos blastocistos produzidos bem como impulsionou a taxa de embriões expandidos e eclodidos, impactando assim positivamente o desenvolvimento e qualidade dos embriões cultivados (Dellaqua *et al.*, 2023). Adamson (1993) também já mostrou que a adição de moléculas da família EGF ao meio de cultivo de embriões de ratos pré-implantação aumentou o número de células embrionárias, dados posteriormente confirmados por Chia *et al.* (1995), evidenciando o potencial destas moléculas na dinâmica de qualidade embrionária e a importância de trabalhos que estudem tais interações. Portanto, mais investigações acerca da NRG1 e seu impacto na PIVE bovina são cruciais para melhor afirmação do seu papel no desenvolvimento e qualidade embrionária.

Os resultados apresentados no trabalho podem ser relevantes para os tratamentos de maturação oocitária e de fertilidade usados em clínicas de reprodução animal e humana, pois apresentam informações valiosas relacionadas à progressão meiótica de oócitos, trazendo como novidade o modelo experimental bovino, espécie monovulatória semelhante às mulheres. Em muitas clínicas humanas, a maturação de oócitos é usualmente impulsionada por injeção de hCG ou um agonista de GnRH ao final de uma estimulação ovariana *in vivo*, de forma que os oócitos recém-aspirados estejam prontos para serem fertilizados, sendo uma técnica com ausência de fatores reguladores diretos da maturação como FSH e EGF-likes (Buratini *et al.*, 2021). Porém, ainda assim alguns oócitos captados na aspiração podem se encontrar em seus estados imaturos, e portanto, uma cultura adicional seria apropriada para fornecer uma chance destes chegarem a MII *in vitro* pré-FIV. Por mais que tais técnicas de maturação oocitária não sejam tradicionalmente aplicadas a humanos por suas taxas de implantação e gestação serem menores do que tratamentos de estimulação ovariana convencionais, estudos sugerem que uma seleção mais precisa de pacientes à serem submetidas à técnica pode melhorar os índices clínicos de MIV, proporcionando um tratamento que pode preservar a fertilidade de pacientes imunossuprimidas, eliminar os efeitos adversos de estimulação por drogas sintéticas e reduzir os custos do procedimento geral do ciclo de reprodução assistida (Ellenbogen *et al.*, 2014; Gilchrist *et al.*, 2016). Outro fator a ser considerado é a necessidade de ajuste dos meios de maturação utilizados, uma vez que eles não correspondem corretamente a dinâmica ovariana, resultando em descompasso na maturação nuclear e citoplasmática oocitária, o que reduz a qualidade embrionária e pode gerar as tais taxas baixas de implantação vistas. Desta forma, os resultados encontrados podem ser utilizados para mostrar a importância da introdução da NRG1 ao meio de cultivo pré-

procedimentos de FIV, tanto em meios convencionais ou mais fisiológicos, a fim de melhorar a sincronia durante a maturação oocitária.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a neuroregulina 1 age na dinâmica de maturação oocitária de forma a retardar a quebra da vesícula germinativa do oócito e assim sincronizar sua maturação nuclear com a citoplasmática, tanto na MIV induzida com FSH quanto com AREG (SF). Embora não foi observada uma ação da proteína durante o desenvolvimento e qualidade embrionária, seus efeitos sobre tais parâmetros ainda necessitam mais avaliações.

7. REFERÊNCIAS

14º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões – SisEmbrio. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/divulgado-relatorio-sobre-fertilizacao-in-vitro-no-pais-em-2020-e-2021>. Acessado em 16 de setembro de 2022.

ADAMSON, E.D. Activities of growth factors in preimplantation embryos. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 53, p. 280-287, 1993.

ALI, A; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 66: p. 901-905, 2002.

Araujo, M.S. **Efeitos da adição do IGF-1 ou IGF-LongR3 sobre aspectos celulares e moleculares de complexos cumulus-oócito durante a maturação oocitária in vitro em bovinos**, 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015.

ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, p. 77-84, 2005.

BANERJEE, S.; MISHRA, S.; XU, W.; THOMPSON, W.E.; CHOWDHURY, I. Neuregulin-1 signaling regulates cytokines and chemokines expression and secretion in granulosa cell. **Journal of Ovarian Research**, v. 15, p. 86, 2022.

BEKER VAN WOUDEBERG, A.; GROLLERS-MULDERIJ, M.; SNEL, C.; JEURISSEN, N.; STIERUM, R.; WOLTERBEEK, A. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 251-260, 2012.

BURATINI, J.; SOARES, A.C.S.; BARROS, R.G.; DELLAQUA, T.T.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M.M.; LUCIANO, A.M. Physiological parameters related to oocyte nuclear differentiation for the improvement of IVM/IVF outcomes in women and cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 34, n.2, p. 27-35, 2021.

BRITSCH, S. The Neuregulin-I ErbB Signaling System in Development and Disease. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**, v. 190, p. 1-65, 2007.

CAIXETA, E.S.; MACHADO, M.F.; RIPAMONTE, P.; PRICE, C.; BURATINI, J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25: p. 890-899, 2013.

CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 7709-7712, 1990.

CHIA, C.M.; WINSTON, R.M.L.; HANDYSIDE, A.H. EGF, TGF-alpha and EGFR expression in human preimplantation embryos. **Development**, v. 121, p. 299-307, 1995.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology** v. 20, p. 715-723, 2006.

CHRONOPOULOU, E.; HARPER, J.C. IVF culture media: past, present and future. **Human Reproduction Update**, v. 21, p. 39-55, 2014.

DE GEYTER, C. Assisted reproductive technology: Impact on society and need for surveillance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 33, p. 3-8, 2019.

DELLAQUA, T.T.; VÍGARO, R.A.; BURATINI, J. Neuregulin 1 (NRG1) modulates oocyte nuclear maturation during IVM and improves post-IVF embryo development. **Theriogenology**, v. 195, p. 209-216, 2023.

ELLENBOGEN, A.; SHAVIT, T.; SHALOM-PAZ, E. IVM results are comparable and may have advantages over standard IVF. **Facts Views & Vision in Obgy**, v. 6: p. 77, 2014.

FALLS, D.L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. **The EGF Receptor Family**, p. 15-31, 2003.

FARIN, C.E.; HASLER, J.F.; MARTUS, N.S.; STOKES, J.E. A comparison of Menezo's B2 and tissue culture Medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 48, p. 699-709, 1997.

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

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

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

FREISTEDT, P.; STOJKOVIC, P.; WOLF, E.; STOJKOVIC, M. Energy Status of Nonmatured and In Vitro-Matured Domestic Cat Oocytes and of Different Stages of In Vitro-Produced Embryos: Enzymatic Removal of the Zona Pellucida Increases Adenosine Triphosphate Content and Total Cell Number of Blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 793-798, 2001.

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

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 159-177, 2008.

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

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

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

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

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

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

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, p. 741-766, 2000.

KIRKEGAARD, K.; AGERHOLM, I.E.; INGERSLEV, H.J. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. **Human Reproduction**, v. 27, p. 1277-1285, 2012.

KONG, X.; YANG, S.; GONG, F.; LU, C.; ZHANG, S.; LU, G.; LIN, G. The Relationship between Cell Number, Division Behavior and Developmental Potential of Cleavage Stage Human Embryos: A Time-Lapse Study. **PLoS One**, v. 11, e0153697, 2016.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MAZIERO, R.R.D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v. 11, p. 150-158, 2014.

LAWRENCE, T.S.; DEKEL, N.; BEERS, W.H. Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli oophori and granulosa cells: a comparative study. **Endocrinology**, v. 106, p. 1114-1118, 1980.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J.; SINGH, J. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. **Reproduction**, v. 134, p. 233-239, 2007.

MAO, J.; WHITWORTH, K.M.; SPATE, L.D.; WALTERS, E.M.; ZHAO, J.; PRATHER, R.S. Regulation of oocyte mitochondrial DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during in vitro maturation affects embryo development in pigs. **Theriogenology**, v. 78, p. 887-897, 2012.

MILEWSKI, R.; KUC, P.; KUCZYNSKA, A.; STANKIEWICZ, B.; LUKASZUK, K.; KUCZYNSKI, W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, p. 571-579, 2015.

NEBLETT, M.F.; KIM, T.; JONES, T.L.; BAUMGARTEN, S.C.; CODDINGTON, C.C.; ZHAO, Y.; SHENOY, C.C. Is there still a role for cleavage-stage embryo transfer? **F&S Reports**, v. 2, p. 269-274, 2021.

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

PANDEY, A.; GUPTA, S.C.; GUPTA, N. Effect of FSH and LH hormones on oocyte maturation of buffalo and gene expression analysis of their receptors and Cx43 in maturing oocytes. **Zygote**, v. 18, p. 231-234, 2010.

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

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

RICHANI, D.; GILCHRIST, R.B. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. **Human Reproduction Update** v. 24, p. 1-14, 2017.

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

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

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

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

SANTOS, R.R.; SCHOEVERS, E.J.; ROELEN, B.A. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 12, p. 1-12, 2014.

SCHNEIDER, M.R.; WOLF, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218: p. 460-466, 2009.

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

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

SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68, p. 71-76, 2007.

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

SUGIMURA, S.; AKAI, T.; HASHIYADA, Y.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; HIRAYAMA, M.; YAMANOUCHI, T.; MATSUDA, H.; KOBAYASHI, S.; AIKAWA, Y.; OHTAKE, M.; KOBAYASHI, E.; KONISHI, K.; IMAI, K. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. **PLoS One**, v. 7, e36627, 2012.

SUGIMURA, S.; RITTER, L.J.; SUTTON-MCDOWALL, M.L.; MOTTERSHEAD, D.G.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, p. 499-513, 2014.

VAN TOL, H.T.A.; VAN EIJK, M.J.T.; MUMMERY, C.L.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 45, p. 218-224, 1996.

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

ZENG, F.; HARRIS, R.C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 28, p. 2-11, 2014.