



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu

Nathalia Romeiro Silva

**IMPACTO DA ASSOCIAÇÃO NPPC/NRG1 E DA
ESTIMULAÇÃO SEQUENCIAL DURANTE A MATURAÇÃO
OOCITÁRIA IN VITRO (MIV) SOBRE A PROGRESSÃO MEIÓTICA
E A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA**

Botucatu
2025

Nathalia Romeiro Silva

**IMPACTO DA ASSOCIAÇÃO NPPC/NRG1 E DA
ESTIMULAÇÃO SEQUENCIAL DURANTE A MATURAÇÃO
OOCITÁRIA *IN VITRO* (MIV) SOBRE A PROGRESSÃO MEIÓTICA
E A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Biotecnologia

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. José Buratini

Botucatu
2025

S586i

Silva, Nathalia Romeiro Silva

Impacto da associação NPPC/NRG1 e da estimulação sequencial durante a maturação oocitária in vitro (MIV) sobre a progressão meiótica e a produção embrionária / Nathalia Romeiro Silva Silva. -- Botucatu, 2025

46 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: José Buratini Junior

1. Competência oocitária. 2. Retomada meiótica. 3. NPPC. 4. NRG1. 5. Produção embrionária in vitro. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa contribui de forma relevante para o aprimoramento de técnicas de reprodução assistida, especialmente para protocolos de maturação *in vitro*, que ainda enfrentam dificuldades na aplicação. A proposta de estratégias mais fisiológicas que consideram os eventos naturais do folículo/oócito e a introdução de um sistema de cultivo bifásico se mostra como uma possível alternativa para melhorar a qualidade dos oócitos maturados *in vitro* e, conseqüentemente, os índices de produção embrionária. Nesse contexto, a inclusão do peptídeo natriurético tipo C para prolongar a fase de parada meiótica e da ampirregulina e neurorregulina para indução da cascata de maturação constituem alternativas interessantes.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research makes a relevant contribution to the advancement of assisted reproduction techniques, particularly in protocols for *in vitro* maturation, which still face challenges in their application. The proposal of more physiological strategies that take into account the natural events of the follicle/oocyte, along with the introduction of a biphasic culture system, emerges as a potential alternative to improve the quality of *in vitro* matured oocytes and, consequently, embryonic production rates. In this context, the inclusion of C-type natriuretic peptide to prolong the meiotic arrest phase, as well as amphiregulin and neuregulin to induce the maturation cascade, represent promising alternatives.

Nathalia Romeiro Silva

**IMPACTO DA ASSOCIAÇÃO NPPC/NRG1 E DA
ESTIMULAÇÃO SEQUENCIAL DURANTE A MATURAÇÃO
OOCITÁRIA *IN VITRO* (MIV) SOBRE A PROGRESSÃO MEIÓTICA
E A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Biotecnologia

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr. José Buratini Junior
UNESP – Câmpus de Botucatu

Prof^a. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
UNESP – Câmpus de Assis

Dr^a Ana Caroline Silva Soares
Progest – Botucatu

Botucatu
21 de agosto de 2025

RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) de complexos *cumulus*-oócitos (COCs) é uma técnica essencial na produção de embriões *in vitro*, embora sua eficácia ainda seja limitada. Este projeto comparou diferentes protocolos de MIV, visando desenvolver uma estratégia mais fisiológica utilizando ampirregulina (AREG), neurorregulina 1 (NRG1) e peptídeo natriurético do tipo C (NPPC) em diferentes momentos da maturação. Os COCs foram aspirados de folículos de ovários bovinos obtidos em abatedouro local e distribuídos nos experimentos. Comparou-se os grupos: FSH: maturação contínua com dosagem convencional de FSH por 22 horas; Sequencial 6h: meio com FSH em dose correspondente à concentração intrafolicular pré-ovulatória, IGF1, estradiol e progesterona por 6 horas, seguido da adição de AREG e NRG1 por mais 16 horas; Sequencial NPPC 6h: idêntico ao Sequencial 6h, exceto pela adição de NPPC nas 6 primeiras horas. Os grupos foram avaliados quanto à progressão meiótica após 8, 10 e 22 horas de maturação. Os mesmos três tratamentos foram prolongados até 24 horas de maturação, e, após esse período, os COCs foram submetidos à fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) para avaliação da formação de blastocistos. Além disso, avaliou-se o impacto de uma maior exposição ao NPPC pela comparação dos grupos: FSH (idêntico ao tratamento FSH, mas por 14 horas); Sequencial NPPC 9h: idêntico ao Sequencial 6h, exceto pela adição de NPPC por 9 horas e Sequencial NPPC 12h: idêntico ao Sequencial 6h, exceto pela adição de NPPC por 12 horas. Os grupos foram avaliados após 11 e 14 horas de MIV. Para analisar a progressão meiótica os oócitos foram desnudos, corados em Hoechst, avaliados em microscópio de epifluorescência e classificados em vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase-telófase (AnaTel), metáfase II (MII) e degenerado (DEG). Após 8 horas de MIV, os grupos FSH ($54.63 \pm 6.67\%$) e Sequencial NPPC 6h ($50.92 \pm 7.40\%$) obtiveram taxas de GV semelhantes, enquanto o Sequencial 6h ($19.58 \pm 5.96\%$) apresentou uma taxa reduzida em relação aos primeiros. Às 10 horas, a taxa de GVBD + MI foi menor no FSH ($59.84 \pm 7.40\%$) e similar entre o Sequencial 6h ($92.71 \pm 0.52\%$) e Sequencial NPPC 6h ($90.68 \pm 3.20\%$). Não foram observadas diferenças significativas quanto às taxas de expansão dos COCs, clivagem, formação de blastocistos, embriões expandidos e eclodidos e número de células embrionárias totais ($p > 0,05$). Após 11 horas de MIV, os grupos FSH ($12.77 \pm 2.8\%$) e Sequencial NPPC 9h ($11.68 \pm 4.92\%$) apresentaram taxas

semelhantes de GV, enquanto o Sequencial NPPC 12h ($29.18 \pm 4.64\%$) apresentou taxas superiores. Apesar dos protocolos não terem resultado em melhorias significativas na produção embrionária, os dados demonstram que os tratamentos influenciaram a dinâmica meiótica, indicando que sua utilização na modulação da maturação oocitária merece maior investigação como estratégia para a melhoria da eficiência da MIV.

Palavras-chave: competência oocitária, retomada meiótica, NPPC, NRG1, produção embrionária *in vitro*

ABSTRACT

In vitro maturation (IVM) of cumulus–oocyte complexes (COCs) is an essential technique in the production of *in vitro* embryos, although its efficiency remains limited. This study compared different IVM protocols aiming to develop a more physiological strategy using amphiregulin (AREG), neuregulin 1 (NRG1), and C-type natriuretic peptide (NPPC) at different stages of maturation. COCs were aspirated from follicles of bovine ovaries collected at a local slaughterhouse and distributed among experimental groups. The groups compared were: FSH – continuous maturation for 22 hours with a conventional dose of FSH; Sequential 6h – medium supplemented with FSH at pre-ovulatory intrafollicular concentration, IGF1, estradiol, and progesterone for 6 hours, followed by the addition of AREG and NRG1 for 16 hours; Sequential NPPC 6h – identical to Sequential 6h, but with NPPC added during the first 6 hours. These groups were evaluated for meiotic progression after 8, 10, and 22 hours of maturation. The same treatments were extended to 24 hours of IVM, after which the COCs underwent *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) for blastocyst formation assessment. Additionally, the impact of longer NPPC exposure was evaluated by comparing the groups: FSH (same as the FSH group, but for 14 hours); Sequential NPPC 9h – identical to Sequential 6h, except for NPPC addition during the first 9 hours; and Sequential NPPC 12h – identical to Sequential 6h, but with NPPC added for 12 hours. These groups were analyzed after 11 and 14 hours of IVM. For meiotic assessment, oocytes were denuded, stained with Hoechst, examined under epifluorescence microscopy, and classified into germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase I (MI), anaphase–telophase (AnaTel), metaphase II (MII), or degenerated (DEG). After 8 hours of IVM, GV rates were similar in the FSH ($54.63 \pm 6.67\%$) and Sequential NPPC 6h ($50.92 \pm 7.40\%$) groups, while the Sequential 6h group showed a significantly lower GV rate ($19.58 \pm 5.96\%$). At 10 hours, the GVBD + MI rate was lower in the FSH group ($59.84 \pm 7.40\%$) and similar between the Sequential 6h ($92.71 \pm 0.52\%$) and Sequential NPPC 6h ($90.68 \pm 3.20\%$) groups. No significant differences were found in COC expansion, cleavage, blastocyst formation, expanded or hatched embryos, or total cell number ($p > 0.05$). After 11 hours of IVM, the FSH ($12.77 \pm 2.8\%$) and Sequential NPPC 9h ($11.68 \pm 4.92\%$) groups presented similar GV rates, whereas the Sequential NPPC 12h group showed a higher GV rate ($29.18 \pm 4.64\%$). Although the protocols did not significantly improve embryo

production, the data demonstrate that the treatments influenced meiotic dynamics, suggesting that their use in modulating oocyte maturation warrants further investigation as a strategy to improve IVM efficiency.

Keywords: oocyte competence, meiotic resumption, NPPC, NRG1, *in vitro* embryo production

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
AnaTel	Anáfase-Telófase
AREG	Ampirregulina
ATP	Adenosina Trifosfato
BTC	Betacelulina
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CC	Células do <i>Cumulus</i>
COC	Complexo <i>Cumulus</i> Oócito
D3	Dia 3 de cultivo
D8	Dia 8 de cultivo
DEG	Degenerado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGF like	Fator de Crescimento Epidermal
EGFR	Receptor de EGF
EREG	Epirregulina
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GV	Vesícula Germinativa
GVBD	Quebra da Vesícula Germinativa
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1
LH	Hormônio Luteinizante
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II

MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator Promotor de Maturação
NPPC	Peptídeo Natriurético do Tipo C
NPR2	Receptor do Peptídeo Natriurético Tipo 2
NRG1	Neurorregulina 1
PDE3	Fosfodiesterase Tipo 3
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína Quinase A
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
SF	Sistema Folicular
SFB	Soro Fetal Bovino
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
TZPs	Projeções transzonais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Maturação oocitária	16
2.1.1	Maturação nuclear	17
2.1.2	Maturação citoplasmática	19
2.2	Fatores reguladores da meiose	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Delineamento experimental	23
3.2	Obtenção dos complexos cumulus-oócito (COCs) <i>post mortem</i>	26
3.3	Maturação oocitária <i>in vitro</i>	26
3.4	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) e Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	28
3.5	Análise da progressão meiótica	29
3.6	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (TRA) representam um avanço importante na área de reprodução animal, especialmente na pecuária, ao viabilizar a produção de embriões *in vitro* e contribuir para potencializar o melhoramento genético e, dessa forma, a produtividade.

Entre as técnicas mais comuns estão a inseminação artificial e a fertilização *in vitro* (FIV), que podem ser precedidas por etapas laboratoriais específicas como a maturação *in vitro* (MIV). A MIV é uma técnica de reprodução assistida que envolve a coleta de complexos *cumulus*-oócito (COCs) imaturos, provenientes de ovários minimamente ou não estimulados, contendo oócitos em estágio de vesícula germinativa (GV) estimulados a completar a maturação até o estágio de metáfase II (MII) *in vitro* a fim de estarem aptos para a fertilização e para sustentar o desenvolvimento embrionário inicial (Lonergan & Fair, 2016).

A história da MIV no Brasil começou na década de 1980 quando pesquisadores testaram diferentes meios de cultivo na busca de um equilíbrio entre os componentes adicionados para ter um desenvolvimento oocitário adequado (Garcia *et al.*, 1988). Os primeiros relatos de embriões bovinos de FIV após MIV ocorreram em 1989 (Mikich *et al.*, 1989). Desde então, essa técnica tem sido amplamente utilizada na produção *in vitro* de embriões (PIVE) de diversas espécies pecuárias como suínos (Herrick *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2012; Okamoto *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2022), equinos (Leemans *et al.*, 2016; Morris, 2018; Lodde *et al.*, 2019) e, principalmente, bovinos (Lonergan and Fair, 2016; Barros *et al.*, 2019; Franchi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Pioltine *et al.*, 2021; Dellaqua *et al.*, 2023a; Janini *et al.*, 2023), na medida em que, em associação à PIVE, permite um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas, as quais têm muitos de seus folículos em degeneração atrésica fisiológica (Ward, 1994).

Apesar de sua longa história, COCs submetidos à MIV para posterior realização de FIV apresentam menor eficiência em termos de taxa cumulativa de nascidos vivos comparada àquela de COCs maturados *in vivo* após estimulação ovariana clássica, o que constitui o principal fator limitante da aplicação da PIVE (Gilchrist, 2011). De fato, estudos clássicos indicam que oócitos maturados *in vitro* apresentam menor competência para a fertilização e desenvolvimento embrionário em comparação a oócitos maturados *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002). No entanto, a menor carga hormonal

associados à MIV podem justificar o investimento em estudos voltados para aumentar sua eficácia.

Um dos possíveis motivos para a baixa taxa de sucesso na produção de embriões provenientes de oócitos maturados *in vitro* é o fato de que os sistemas de cultivo não reproduzem as condições intra-foliculares encontradas *in vivo*. Entre as problemáticas encontradas destaca-se o descompasso entre a maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos. No ambiente folicular, os oócitos permanecem em um estado de parada meiótica, denominado estado de vesícula germinativa (GV), até que o citoplasma complete sua maturação. Posteriormente, com o pico do hormônio luteinizante (LH), mediadores intra-foliculares disparam a retomada da meiose e na diferenciação do *cumulus* (Gilchrist, 2011). Um cultivo sem esse equilíbrio entre os diferentes aspectos da maturação oocitária pode resultar em uma retomada meiótica precoce, prejudicando o desenvolvimento oocitário (Gilchrist *et al.*, 2011). Conseqüentemente, a taxa de sucesso na PIVE é comprometida (Machalkova *et al.*, 2004).

Apesar das limitações dos protocolos de MIV em mimetizar o ambiente e os processos que acontecem *in vivo* durante a maturação oocitária, é fundamental considerar todos os eventos celulares e moleculares que ocorrem no folículo e no complexo cumulus-oócito durante o período de maturação. Os meios comerciais utilizam um sistema de cultivo simples que envolve a retomada espontânea da meiose e a maturação por 24-48 horas (Sutton, *et al.*, 2003b). Atualmente, os meios de cultivo utilizados para bovinos contêm altas dosagens de hormônio folículo estimulante (FSH), que atua como indutor da maturação oocitária *in vitro* por estimular a expressão de ligantes de fatores de crescimento epidermais (EGFs-like) diretamente nas células do *cumulus* (CC), os mediadores fisiológicos da ação do LH na indução da cascata de maturação (Freimann *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004). A exposição aos EGFs-like durante a MIV melhora a competência dos oócitos para o desenvolvimento embrionário, o que acontece pelo efeito positivo na modulação do ambiente citoplasmático do oócito (Richani, *et al.*, 2013).

No entanto, o uso de EGF-like desencadeia a retomada da meiose e a quebra da GV, o que pode ocorrer de forma precipitada, gerando um descompasso entre a maturação citoplasmática e a maturação nuclear do oócito (Gilchrist, 2011). Paralelamente, a retirada do oócito do ambiente folicular estimula a retomada espontânea da meiose, mesmo antes que o oócito alcance grau de maturação

citoplasmática e molecular adequado (Pincus e Enzmann, 1935; Edwards, 1965). Por isso, alguns fatores podem ser adicionados ao meio de cultivo no intuito de modular ou atrasar essa retomada, para que o oócito consiga atingir um estágio de maturação citoplasmática mais adequado para a fertilização, o que inclui a adição de inibidores de fosfodiesterase para manter níveis elevados de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e monofosfato cíclico de guanossina (GMPc), que ajudam a manter a parada meiótica até que a maturação citoplasmática esteja completa (Gilchrist *et al.*, 2008).

O conhecimento dos fatores que regulam a maturação nuclear possibilita a adaptação dos sistemas de cultivo para melhorar a competência do oócito maturado *in vitro*. Nesse contexto, um sistema com diferentes etapas (pré-MIV e MIV) tem sido proposto para otimizar a maturação oocitária.

Uma das primeiras abordagens não contínuas de sistema de maturação oocitária foi denominada de SPOM (Simulated physiological oocyte maturation), criada em 2010 por Albus e colaboradores. No SPOM existem duas fases com diferentes inibidores de fosfodiesterase tipo 3 (PDE3) que resultaram em melhores taxas de desenvolvimento embrionário. Outros sistemas bifásicos exploraram o uso de moduladores de AMPC e GMPc durante a pré-maturação de oócitos humanos, o que resultou em melhoria na competência meiótica (Sanchez, *et al.*, 2017).

Uma estratégia que vem sendo investigada para manter elevados os níveis de GMPc intra-oocitário é a adição do peptídeo natriurético do tipo C (NPPC) no meio de maturação. O NPPC se liga aos receptores de guanilato ciclase nas células da granulosa e estimula a produção de GMPc, o que previne a ativação precoce da maturação nuclear (Zhang *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram que a adição do NPPC no meio de cultivo é eficaz para retardar a retomada meiótica (Franciosi *et al.*, 2014, Soares *et al.*, 2017), possibilitando uma maturação mais coordenada entre os processos nucleares e citoplasmáticos do oócito, o que é essencial para aumentar a competência oocitária e o sucesso da fertilização *in vitro* (Zhang *et al.*, 2010; Vaccari *et al.*, 2009). Assim, o NPPC é um componente importante nos sistemas de maturação *in vitro* e tem potencial para otimizar protocolos de cultivo, melhorando a qualidade dos embriões produzidos (Gilchrist *et al.*, 2016).

Em relação a fase de estímulo da retomada meiótica, pesquisas recentes revelaram que os EGFs-like ampirregulina (AREG) e neurorregulina (NRG1) atuam conjuntamente durante a MIV de camundongos (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014). A combinação desses fatores regula eventos intracelulares essenciais para a

16 retomada meiótica, atuando como importantes ativadores da maturação oocitária (Shimada et al., 2016). Em bovinos, resultados congruentes foram relatados, sugerindo um efeito positivo da adição da NRG1 durante a MIV induzida com AREG sobre a qualidade embrionária (Dellaqua et al., 2023b). Além disso, observou-se que a NRG1 diminuiu a expressão de receptores de EGF (EGFR), um gene relacionado a retomada meiótica e aumentou a expressão do gene NPR2 (Abbassi et al., 2021), que está interligado ao processo de síntese do GMPc, promovendo um ambiente mais favorável à maturação síncrona e ao desenvolvimento oocitário.

Estudos conduzidos em nosso laboratório em colaboração com o Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão culminaram no desenvolvimento de um sistema de cultivo em duas fases denominado Sistema Folicular (SF; Soares *et al.*, 2017). Esse sistema foi projetado para se aproximar das condições fisiológicas dos folículos pré-ovulatórios. A primeira fase é denominada pré-MIV e tem em sua composição o NPPC, no intuito de manter a parada meiótica e aumentar os níveis de GMPc nas CC (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Franciosi *et al.*, 2014). A segunda fase é a MIV, que visa promover a ativação da cascata de maturação com o uso de um indutor fisiológico (AREG), associado ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e concentrações fisiológicas de FSH e hormônios esteroides (Soares *et al.*, 2017).

O aprimoramento do SF tem sido objetivado pelo nosso grupo no intuito de melhorar a qualidade oocitária e a produção embrionária *in vitro*. No presente estudo, inicialmente testamos diferentes concentrações de NPPC associadas ou não a NRG1 na primeira fase de cultivo. Posteriormente, testou-se a associação AREG e NRG1 na segunda fase do cultivo para completar o processo de maturação.

O objetivo central deste estudo foi avaliar o impacto da estimulação sequencial durante a MIV utilizando suplementação com NPPC, AREG e NRG1 sobre a maturação nuclear oocitária e a produção embrionária *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Maturação oocitária

O processo de maturação oocitária se inicia ainda na vida fetal, quando células germinativas primordiais passam por sucessivas mitoses e posteriormente são envolvidas por células foliculares, tornando-se ovogônias (Hyttel *et al.*, 2012). As

ovogônias também se proliferam por sucessivas mitoses e após uma última replicação de seu DNA, essas células entram em divisão meiótica, passando a ser denominadas oócitos (Albertini *et al.*, 2003). A meiose é dividida em duas etapas, sendo que ao final de cada uma há a liberação de um corpúsculo polar. Em mamíferos, o oócito começa a primeira fase da divisão meiótica e para na etapa de diplóteno da prófase I, conhecida como estágio de vesícula germinativa (GV), permanecendo assim até a ativação folicular, que ocorre ao longo da vida reprodutiva da fêmea (Eppig & O'Brien, 1996; Mehlmann, 2005). A retomada desse processo ocorre com o estímulo do pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) (Gilchrist *et al.*, 2008). Dessa forma, a maturação que estava em pausa é retomada e ocorre a nível nuclear e citoplasmático (Eppig, 2001).

2.1.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear consiste na retomada da progressão meiótica e na capacidade do oócito de sair do estágio de prófase I e atingir a metáfase II, adquirindo assim a competência meiótica (Sánchez e Smitz, 2012). Em oócitos imaturos, a parada meiótica depende da manutenção de alta concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O AMPc atua como um mensageiro secundário em diferentes vias de sinalização celular e regula a atividade de diversas proteínas envolvidas na manutenção da parada meiótica (Mehlmann, 2005).

A produção do AMPc pode ocorrer tanto dentro do oócito, quanto nas células adjacentes, como as células do *cumulus* (CC) e as células murais da granulosa (Conti *et al.*, 2002). Nas CC, ocorre a sinalização de receptores acoplados à proteína G que ativam a adenilato ciclase, por fim convertendo ATP em AMPc. A passagem de AMPc das CC para o citoplasma oocitário ocorre através das projeções transzonais (TZPs), extensões das CC que atravessam a zona pelúcida e estabelecem junções comunicantes (junções GAP) com o oócito (Albertini *et al.*, 2001). Essas junções, formadas por proteínas da família das conexinas (Norris *et al.*, 2009), permitem a troca direta de pequenas moléculas entre as células (Macaulay *et al.*, 2014).

A alta concentração de AMPc no meio intracelular inibe a atuação do fator promotor de maturação (MPF), que é uma proteína quinase crucial para a progressão meiótica (Gilchrist, *et al.*, 2011). Isso acontece porque o AMPc ativa e fosforila a proteína quinase A (PKA), que então inativa componentes do MPF, mantendo, portanto, o oócito em parada meiótica na prófase I (Gilchrist, 2011; Downs, 2010).

Quando há o pico de LH a retomada da meiose é desencadeada, o que acontece pela redução dos níveis de AMPc por meio da inibição da adenilato ciclase ou aumento da atividade da fosfodiesterase tipo 3 (PDE3), uma enzima que degrada o AMPc (Zhang *et al.*, 2017). A queda dos níveis de AMPc resulta na inativação da PKA e, logo, na ativação do MPF. O MPF degrada o envoltório nuclear, isto é, promove a quebra da vesícula germinativa (GVBD), retomando a meiose e permitindo ao oócito a progressão até a metáfase II (Adhikari & Liu, 2014), estágio em que é considerado maduro, no quesito nuclear.

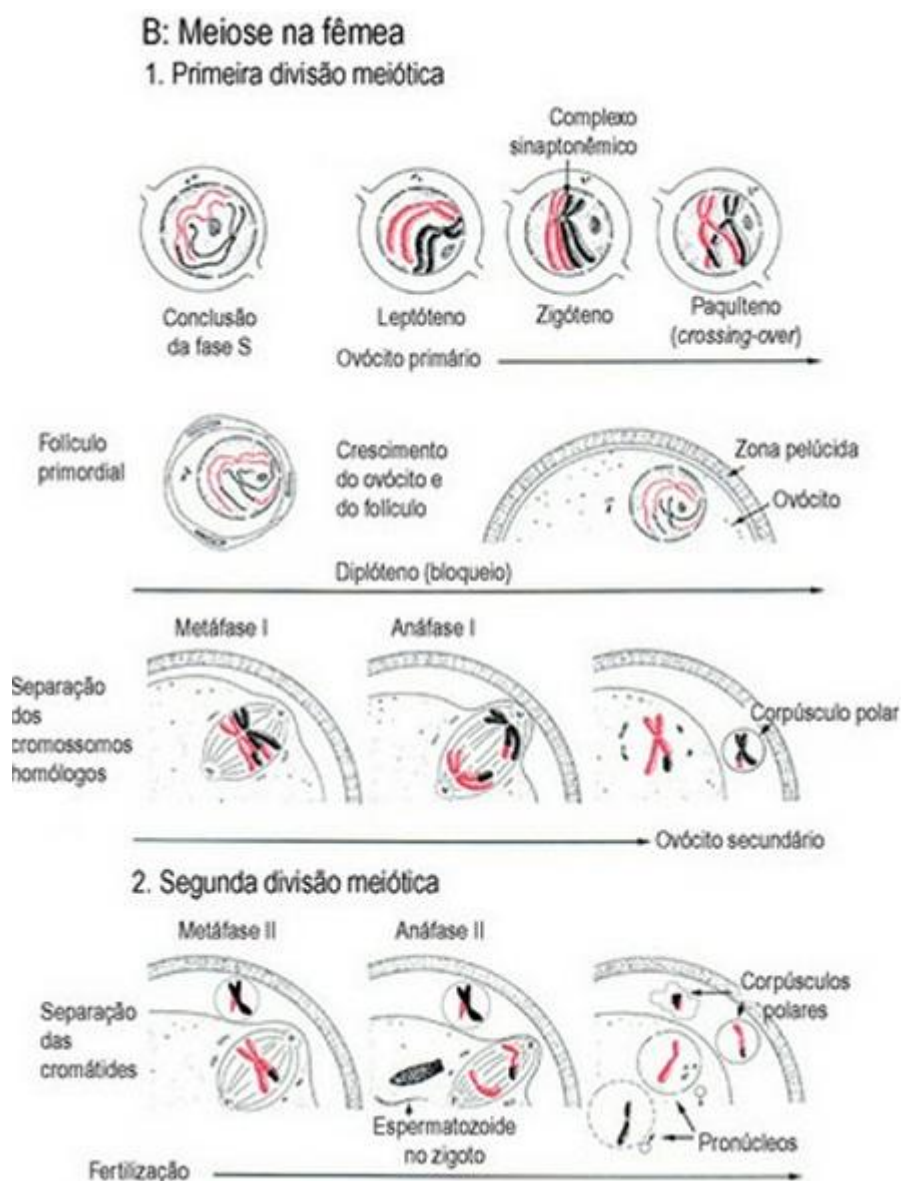


Figura 1. Ilustração retirada do livro *Embriologia Veterinária* (Hyttel *et al.*, 2012) que demonstra as etapas da meiose no oócito. **1)** Após a conclusão da fase de síntese de DNA (fase S) o oócito entra na primeira divisão meiótica, passando por diferentes

fases da prófase e de conformação da cromatina (leptóteno, zigóteno e paquíteno) até alcançar o diplóteno, momento em que ocorre o bloqueio meiótico. Esse bloqueio pode se estender por longos períodos, sendo a retomada observada apenas nos oócitos recrutados a partir da puberdade, de forma progressiva ao longo da vida reprodutiva. Com a retomada do ciclo, ocorre a separação dos cromossomos homólogos e a liberação do primeiro corpúsculo polar. **2)** Na segunda divisão meiótica o oócito atinge a aptidão para fertilização com o espermatozoide (metáfase II), e, após isso, a meiose é finalizada com a extrusão do segundo corpúsculo polar e a formação do zigoto.

2.1.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática e a maturação nuclear são processos distintos, mas que acontecem simultaneamente durante a maturação oocitária. Um oócito com competência meiótica não necessariamente tem maturidade citoplasmática (Sánchez e Smitz, 2012), o que pode acontecer devido ao descompasso entre esses processos, resultando em oócitos com pouca competência para serem fecundados e progredirem no desenvolvimento embrionário.

Durante a maturação citoplasmática há uma redistribuição das organelas do citoplasma, rearranjo do citoesqueleto e maturação molecular (Ferreira *et al.*, 2009). As mitocôndrias, que são responsáveis pela produção de energia celular, inicialmente se encontram na periferia do oócito antes do pico de LH. Posteriormente, elas migram para o centro do citoplasma, um processo que é mediado pelos microtúbulos do citoesqueleto (Muggleton-Harris e Brown, 1988; Sathananthan e Trounson, 2000). A migração mitocondrial é de suma importância pois sua distribuição adequada é necessária para a produção de ATP, essencial nas demandas energéticas durante a meiose e posteriormente no desenvolvimento embrionário (Dumollard *et al.*, 2006). Além disso, há migração dos grânulos corticais em direção à membrana plasmática em preparação para a exocitose durante a fertilização (Hyttel *et al.*, 2012). Já o rearranjo do citoesqueleto envolve organização dos microtúbulos e microfilamentos, os quais são essenciais na formação do fuso meiótico e na segregação cromossômica (Sun e Schatten, 2006).

A maturação molecular está interligada à maturação citoplasmática e envolve a síntese e acúmulo de RNAs e proteínas. Dessa forma, ela está relacionada à atuação de organelas como os ribossomos, o retículo endoplasmático (RE) e o complexo de

Golgi (Assey *et al*, 1994). Os ribossomos atuam na tradução de RNAm, e, associados ao RE, sintetizam proteínas essenciais para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (Sirard *et al.*, 2006). Já o complexo de Golgi atua na secreção de moléculas e no transporte de proteínas e lipídios que formam membranas celulares (Malhotra *et al.*, 1989). Além disso, a comunicação bidirecional entre oócito e CC, mediada pelas TZPs e suas junções comunicantes, é fundamental para a maturação molecular, pois permite a transferência de substratos energéticos, fatores antioxidantes, RNAs e outros reguladores necessários para a competência oocitária (Macaulay *et al.*, 2014, Buratini *et al*, 2021). A figura abaixo ilustra os processos que ocorrem durante a maturação citoplasmática.

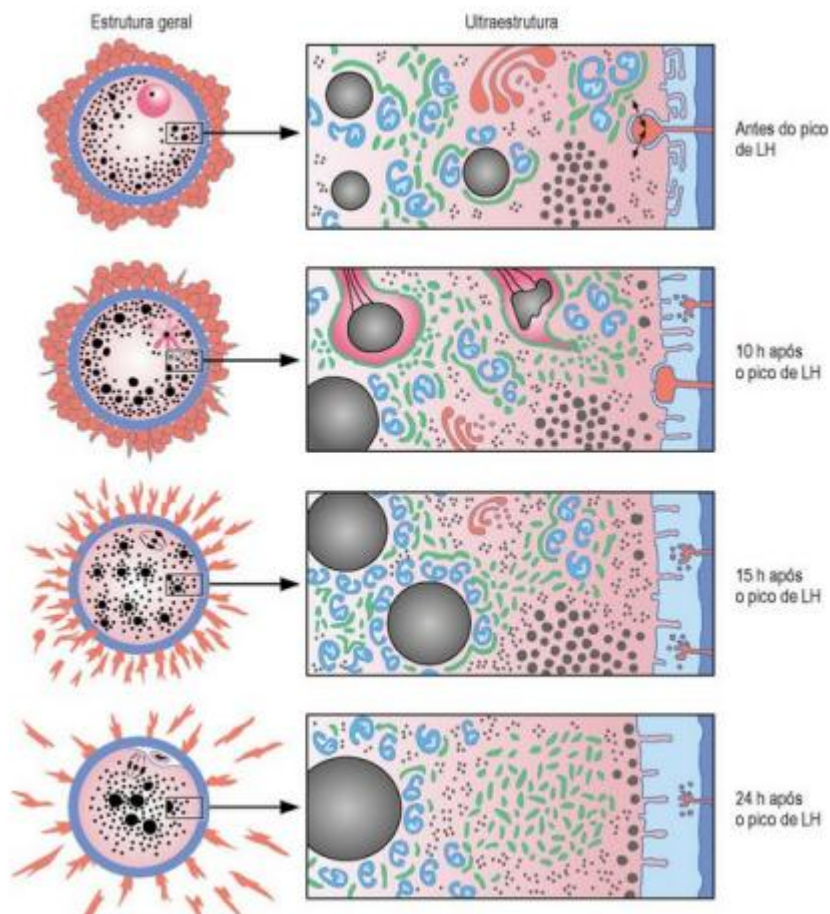


Figura 2. Ilustração retirada do livro Embriologia Veterinária (Hyttel *et al.*, 2012). Maturação oocitária em bovinos ao longo do tempo. **A)** Antes do pico de LH o oócito se encontra em parada meiótica na prófase I. A GV é localizada periféricamente (rosa), e as organelas estão distribuídas nas periferias do citoplasma. O oócito apresenta retículo endoplasmático liso (REL, verde) associado a gotículas de lipídios (esferas

pretas grandes) e mitocôndrias (azul), complexo de Golgi (vermelho) e grânulos corticais aglomerados (esferas pretas pequenas. **B**) Cerca de 10 horas após o pico de LH ocorre a retomada meiótica. Há o rompimento da vesícula germinativa e os microtúbulos (linhas pretas) se associam aos cromossomos em condensação para formação do fuso meiótico. **C**) Aproximadamente 15 horas após o pico de LH, o oócito atinge a metáfase I. As gotículas de lipídio aumentam em volume e em quantidade. As mitocôndrias se organizam em torno das gotículas, distribuindo-se pelo citoplasma. Numerosos ribossomos (pontos pretos) surgem, principalmente em torno dos cromossomos. **D**) Cerca de 24 horas após o pico de LH o oócito atinge a metáfase II e tem a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Os grânulos corticais se encontram próximos à membrana plasmática. As gotículas de lipídio e as mitocôndrias ocupam posições mais centrais e a periferia é pouco ocupada por organelas.

2.2 Fatores reguladores da meiose

O hormônio LH estimula a ovulação e a luteinização dos folículos pré-ovulatórios (Richards *et al.*, 1998), promove a expansão das CC e a maturação oocitária (Richards *et al.*, 2002; Noma *et al.*, 2011). Dessa forma, o LH está diretamente envolvido na regulação da meiose. Ele induz a expressão de fatores de crescimento epidermais (EGFs), conhecidos como “fatores EGF-like”, nas células da granulosa, como a ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC) (Conti *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2016).

Os EGFs são proteínas pertencentes a uma família composta pelo EGF e fatores 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), AREG, EREG, BTC e as neurorregulinas de 1 a 4 (NRG1-4) (Harris *et al.*, 2003; Schneider & Wolf, 2009; Richani & Gilchrist, 2017). Os EGFs-like atuam por ligações a receptores específicos na superfície celular, ativando vias de sinalização que promovem o crescimento e a divisão celular (Harris *et al.*, 2003).

Nos mamíferos, as CC não possuem receptores para o LH, e, portanto, dependem da produção de EGF-likes para mediar os efeitos do LH (Richani *et al.*, 2013). Uma vez sintetizados nas células murais da granulosa, os EGF-likes ativam seus receptores nas CC (Gilchrist, 2011) e, por meio da via de sinalização MAPK/ERK (ativada pela AREG) e da via PKB/AKT (ativada pela NRG1), estimulam a retomada

da meiose, a maturação oocitária e a expressão de genes promotores da expansão do *cumulus* (Freimann *et al.*, 2004).

A ativação do receptor (EGFR) pela AREG promove a queda nos níveis de AMPc nas CC ao fechar as junções GAP e a retração das TZPs (Macaulay *et al.*, 2014), que normalmente permitiriam a passagem de AMPc e do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), inibidores da meiose (Robinson *et al.*, 2012). O GMPc é produzido nas CC e é ativado pela sinalização do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) quando ele se liga ao receptor do peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2) nas CC e estimula a produção de GMPc, que é transferido para o oócito (Zhang *et al.*, 2010). O GMPc inibe a PDE3, enzima responsável pela degradação do AMPc (Gilchrist, 2011). A redução do fluxo de GMPc permite a hidrólise do AMPc, diminuindo a inibição da proteína quinase A (PKA). Conseqüentemente, o fator promotor de maturação (MPF) é desfosforilado e ativado, permitindo ao oócito retomar a meiose e progredir para a metáfase II (Sánchez e Smitz, 2012, Vaccari *et al.*, 2009).

A NRG1 também é expressa em resposta ao LH nas células da granulosa e atua em vias complementares. Enquanto a AREG se liga ao receptor EGFR, também conhecido como ErbB1 ou HER (Conti *et al.*, 2006) e ativa a via ERK1/2 (Freimann *et al.*, 2004), a NRG1 interage com o receptor ErbB3 que desencadeia a via de sinalização PKB/AKT (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014), a qual está relacionada à modulação da retomada meiótica, possivelmente por sua atuação sobre a via da PDE3 e do AMPc (Shimada *et al.*, 2016). Além disso, a sinalização promovida pela AREG e pela NRG1 pode ocorrer de forma sinérgica, contribuindo para a redução dos níveis de GMPc e AMPc nas CC e favorecendo a ativação do MPF no oócito (Falls, 2003; Shimada & Yamashita, 2011). Dessa forma, AREG e NRG1 promovem, por vias distintas, mas complementares, a retomada da meiose e a progressão para a metáfase II, reforçando sua relevância como moduladores-chave nos protocolos de maturação *in vitro* (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014).

Já em relação à promoção da expansão do *cumulus*, os EGF-like estimulam a produção de ácido hialurônico e outros componentes que favorecem esse processo e facilitam a liberação do oócito durante a ovulação (Park *et al.*, 2004). A expansão das CC é um evento essencial durante a maturação oocitária e está diretamente ligada à comunicação bidirecional entre oócito e CC (Haghighat & Van Winkle, 1990; Assidi *et al.*, 2008). Essa comunicação, mediada por junções GAP, permite a transferência de moléculas como AMPc, GMPc e RNAm, fornecendo suporte metabólico e regulatório

para o desenvolvimento e a progressão da maturação oocitária (Macaulay *et al.*, 2014; Buratini *et al.*, 2021). Esses mecanismos são fundamentais para a retomada meiótica, e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de competência oocitária para a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Gilchrist *et al.*, 2008). Sendo assim, no contexto da maturação *in vitro*, a expansão das CC é utilizada como um marcador morfológico indireto da competência dos oócitos cultivados.

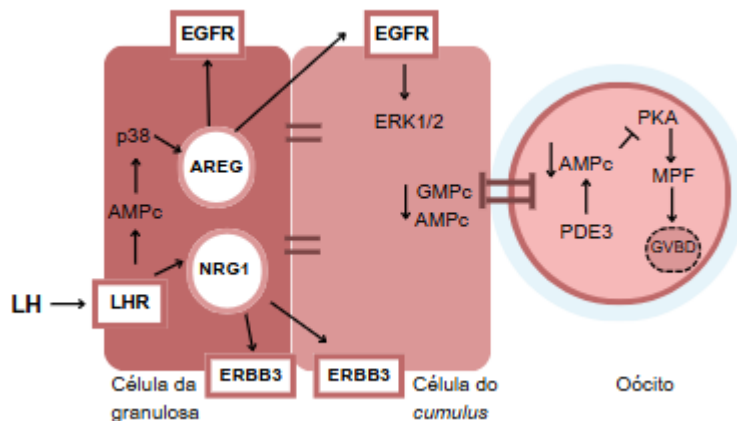


Figura 3. Cascata de sinalização gerada pelo pico de LH na maturação oocitária. A sinalização induzida pelo pico de LH nas células da granulosa promove a expressão de fatores da família EGF-like, como AREG e NRG1, que atuam nas CC. A AREG se liga ao receptor ErbB1 (EGFR) e ativa a via de sinalização ERK 1/2, que resulta na diminuição dos níveis de AMPc e GMPc nas CC, permitindo a retomada meiótica do oócito. Por sua vez, a NRG1 atua principalmente pelo receptor ErbB3, cuja ativação desencadeia a via PKB/AKT, também envolvida na modulação da retomada meiótica. A ativação dessas vias leva à regulação da PDE3, redução dos níveis de AMPc nas CC, redução da inibição da PKA e conseqüente ativação do MPF.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Os efeitos da MIV sequencial associada ao uso de NPPC e NRG1 foram testados em uma sequência de quatro experimentos. No experimento 1 avaliou-se o impacto da adição de NPPC em diferentes concentrações, 0, 25, 50 e 100nM, associadas ou não à NRG1 durante as 6 horas iniciais da MIV. As diferentes

concentrações de NPPC foram testadas utilizando-se o mesmo meio de base, com o intuito de definir a melhor dose efetiva de NPPC e se o impacto deste fator poderia ser potencializado na presença de NRG1. Os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst para análise da GV.

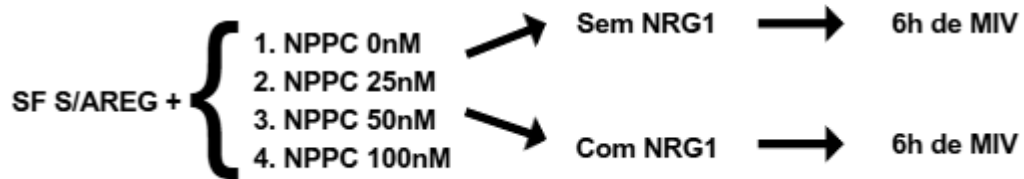
No experimento 2, após definição da concentração de NPPC, essa dose foi utilizada nas 6 primeiras horas da MIV. Em seguida, o meio de cultivo foi substituído pelo Sistema Folicular (SF), anteriormente elaborado pelo laboratório, acrescido de NRG1 (SF+ N). Foram comparados três grupos: FSH com maturação contínua, maturação bifásica no SF sem AREG (Sequencial 6h) por 6 horas, seguida de SF +N, e maturação bifásica do melhor tratamento do experimento 1 (Sequencial NPPC 6h) por 6 horas seguida de SF + N. Os COCs foram desnudos e corados com Hoechst para análise da progressão meiótica às 8, 10 e 22 horas de MIV.

No experimento 3 analisou-se os efeitos dos tratamentos do experimento 2 sobre a produção embrionária. Os mesmos grupos foram submetidos à MIV por 24 horas, após o que os COCs foram submetidos à FIV e ao CIV. No terceiro dia de cultivo (D3) analisou-se a taxa de clivagem. Após 8 dias de cultivo completos, no oitavo dia de cultivo (D8) a produção embrionária foi avaliada e os embriões foram corados com Hoechst para a contagem total das células embrionárias.

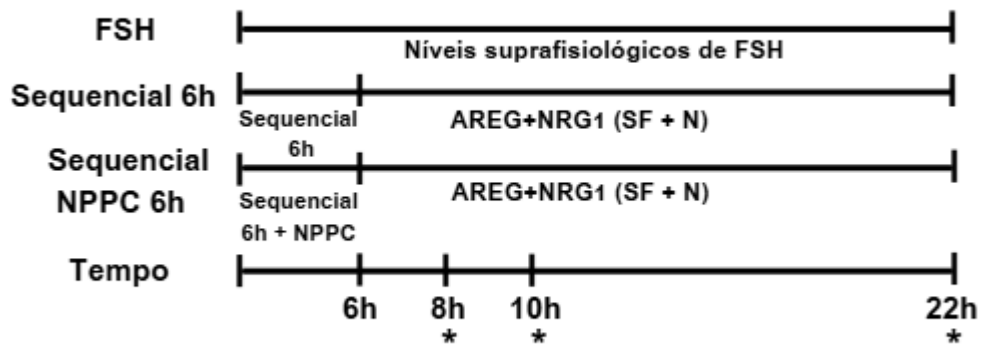
No experimento 4 foi mantida a concentração de NPPC previamente selecionada no experimento 1, testando-se sua aplicação na primeira etapa da MIV por dois períodos distintos: 9 horas e 12 horas. Após esses intervalos os meios de cultivo foram substituídos pelo meio SF + N para continuidade da maturação. Os grupos experimentais foram: FSH (maturação contínua), grupo Sequencial NPPC 9h, no qual os COCs permaneceram por 9 horas no meio com NPPC antes da troca para SF + N, e grupo Sequencial NPPC 12h, com a troca para o meio SF + N às 12 horas da MIV. Os COCs foram desnudos e corados com Hoechst para análise da progressão meiótica às 11 e 14 horas de MIV.

Os experimentos foram realizados com grupos contendo pelo menos 20 oócitos em 5 réplicas. O delineamento experimental está ilustrado abaixo (Fig. 1) e a composição dos meios é definida a seguir.

Experimento 1

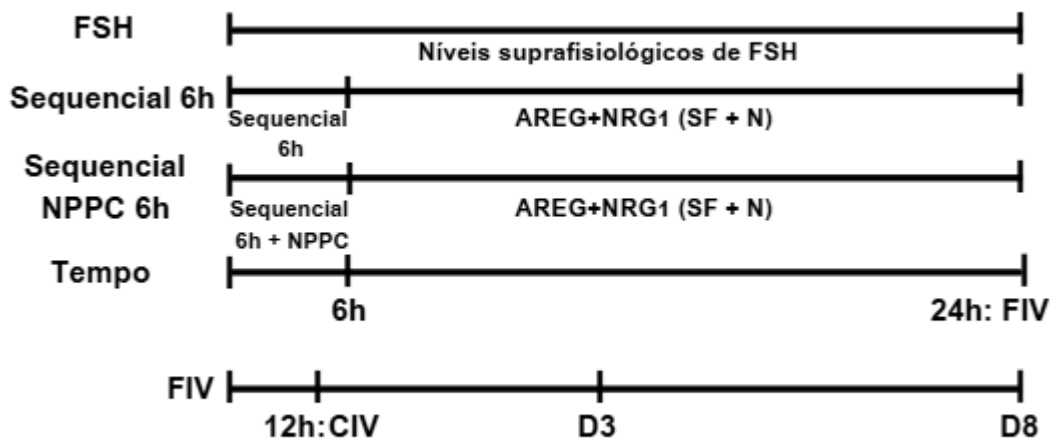


Experimento 2



* Retirada da MIV para análise da parada meiótica.

Experimento 3



D3: Análise da clivagem

D8: análise dos blastocistos

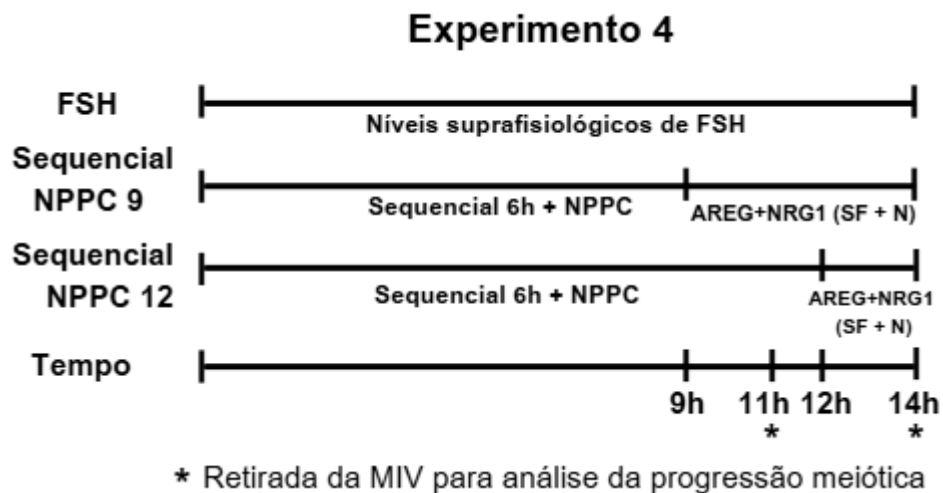


Figura 4. Representação esquemática do sistema de maturação proposto nos quatro experimentos com os principais indutores e procedimentos.

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

Os COCs foram coletados de ovários bovinos obtidos em abatedouro local. Os ovários foram conduzidos ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) aquecida à 37°C e utilizados imediatamente. Após a higienização dos mesmos com solução salina e álcool 70%, foi realizada a aspiração do fluido folicular dos folículos com diâmetro de 2 a 8 mm com o uso de seringa de 10 mL e agulha 19G. O fluido folicular obtido foi depositado em tubos de 15mL e estes foram mantidos em banho maria a 37°C até a formação de um pellet. Após sedimentação no líquido folicular, os COCs foram recuperados e selecionados em um estereomicroscópio. Apenas oócitos com citoplasma homogêneo e pelo menos cinco camadas de células do cumulus foram utilizados nos experimentos.

3.3 Maturação oocitária *in vitro*

Após a seleção, os COCs foram lavados em meio TCM 199 com sais de Earle e 25mM de HEPES (ambos Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com amicacina (75µg/mL) e albumina sérica bovina (BSA, 4mg/mL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), denominado meio LAV. Os COCs foram separados em grupos com 25-30 e transferidos para a placa de maturação. Placas de 4 poços (NUNC® ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foram previamente preparadas com 500µL de meio por poço. Em todos os experimentos foi utilizado meio de maturação base composto por TCM 199 com sais de Earle (Sigma Aldrich St. Louis, MO, EUA) e

bicarbonato, suplementado com piruvato (22 μ L/mL), amicacina (75 μ g/mL), BSA (4mg/mL) e cisteamina (10 μ L/mL). Após a transferência dos COCs para as placas, elas foram colocadas na incubadora à temperatura de 38,5°C e umidade saturada do ar com 5,5% de CO₂.

Experimento 1: o primeiro experimento foi feito para determinar a concentração ideal de NPPC no meio de maturação e a sua interação com a NRG1. Para isso, 8 grupos diferentes foram testados e todos eram compostos pelo meio de maturação base acrescido de r-hFSH (0,01 UI/mL, rh-FSH, Gonal-[®], Merck Serono S.A, Aubonne, Suíça), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1, 10 ng/mL), 17 β -estradiol (50 ng/mL) e progesterona (150 ng/mL) denominado como meio SF sem AREG (Grupo Sequencial). Diferentes concentrações de NPPC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionadas ao meio, sendo elas: 0, 25, 50 ou 100nM, o que corresponde aos grupos N0, N25, N50 e N100, respectivamente. Além disso, essas mesmas concentrações foram associadas a 1 ng/mL de NRG1 (rh-Neuregulin 1, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), o que corresponde aos grupos N + N0, N + N25, N + N50 e N + N100. Todos os grupos ficaram na incubadora durante 6 horas de cultivo e após esse período os oócitos foram desnudos e fixados em metanol 60% para posterior análise da progressão meiótica.

Experimento 2: a partir do experimento 1 determinou-se que o grupo com maior impacto positivo foi o N50. Sendo assim, ele foi utilizado para testar sua eficiência na MIV sequencial. Foram testados 3 grupos diferentes, sendo eles: (1) FSH, meio de maturação base acrescido de r-hFSH (0,1 UI/mL) como grupo controle; (2) Grupo Sequencial 6h, já descrito anteriormente, e (3) Grupo Sequencial NPPC 6h, correspondendo ao meio N50. Para a MIV sequencial, os grupos Sequencial 6h e Sequencial NPPC 6h tiveram a troca do meio de cultivo após 6 horas de maturação para o meio composto por r-hFSH (0,01 UI/mL), AREG (100 ng/mL, rh-Amphiregulin, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), NRG1 (1 ng/mL), IGF1 (10 ng/mL), 17 β -oestradiol (50 ng/mL) e progesterona (150 ng/mL) denominado SF + N. Os COCs foram maturados e analisados após 8, 10 e 22 horas de cultivo, seguindo o mesmo protocolo de desnudar e fixar em metanol 60%.

Experimento 3: foram utilizados os mesmos grupos de tratamentos do experimento 2, que passaram por 24 horas de maturação. Os grupos Sequencial 6h e Sequencial NPPC 6h tiveram a troca do meio depois de 6 horas de cultivo. Após o período de maturação, os COCs foram classificados quanto ao grau de expansão das

CC, com base na morfologia e no número de camadas celulares. A classificação foi feita em três graus (1, 2 e 3), em ordem crescente de expansão, sendo, grau 1: pouca ou nenhuma expansão das CC, grau 2: expansão parcial das camadas de CC, grau 3: expansão total das CC, com múltiplas camadas celulares e maior competência oocitária. Posteriormente foram submetidos a FIV e ao CIV para a avaliação das taxas de clivagem e formação de blastocistos.

Experimento 4: a partir dos resultados obtidos nos experimentos 2 e 3 decidiu-se testar novos horários para a troca dos meios no cultivo sequencial. Sendo assim, ao invés de realizar a troca após 6 horas de maturação, ela foi feita em dois novos horários: após 9 horas e após 12 horas. Foram testados três grupos diferentes: (1) FSH, meio de maturação base acrescido de r-hFSH (0,1 UI/mL) como grupo controle; (2) Grupo Sequencial NPPC 9h, correspondendo ao meio N50 por um período de 9 horas e posterior troca para o meio SF + N, semelhante ao do experimento 2 e (3) Grupo Sequencial NPPC 12h, correspondendo ao meio N50 por um período de 12 horas e posterior troca para o meio SF + N. Os COCs foram maturados e analisados após 11 e 14 horas de cultivo, seguindo o mesmo protocolo de desnudar e fixar em metanol 60%.

3.4 Fertilização *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV)

Para realizar a FIV utilizou-se protocolo baseado em Soares *et al.* (2017). Espermatozoides criopreservados foram separados em 45% - 90% de gradiente de Select Sperm[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), foram contados e adicionados nos diferentes poços na concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL. COCs e espermatozoides foram colocados em placas de 4 poços (NUNC[®]) contendo 300 μ L de meio FIV[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) durante 12h a 38,5°C em 5,5% de CO₂ com ar umidificado. Depois desse período, os prováveis zigotos foram desnudos por sucessivas pipetagens em meio LAV e transferidos para placa de 4 poços (NUNC[®]) com 500 μ L de meio de cultivo embrionário CIV[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) enriquecido com 2,5% de soro fetal bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil). O cultivo foi realizado em incubadora com mistura gasosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ a 38.5°C em ar umidificado. No terceiro dia de cultivo (D3) foi avaliada a taxa de clivagem dos embriões formados, no estereomicroscópio. Após oito dias de cultivo (D8), avaliou-se a taxa de blastocistos, com classificação dos embriões em não expandidos (blastocistos iniciais e blastocistos), expandidos e eclodidos

(IETS, 4ª edição). Os embriões foram fixados em metanol 60% e posteriormente colocados entre lâmina e lamínula com glicerol e Hoechst 33342 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Após a coloração os núcleos celulares da trofotoderme e da massa celular interna foram contados em microscópio de fluorescência.

3.5 Análise da progressão meiótica

Após os tempos de maturação descritos para os experimentos 1, 2 e 4, os oócitos foram desnudos por sucessivas pipetagens em meio LAV. Os oócitos foram fixados em metanol 60%, corados com Hoechst 33342 e glicerol e colocados entre uma lâmina e lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência e classificadas quanto a progressão meiótica por meio da análise do material genético em diferentes fases, sendo elas: vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase-telófase (AnaTel), metáfase II (MII) e degenerado (DEG) (Luciano and Lodde, 2013).

3.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos ao menos cinco vezes e com no mínimo 20 oócitos por grupo. Os efeitos dos tratamentos descritos acima foram testados utilizando-se o software GraphPad Prism. Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Para dados com distribuição normal, utilizou-se ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparação dos grupos. No caso de distribuição não-normal, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Embora alguns dados não tenham apresentado distribuição normal, optou-se por manter a apresentação dos resultados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM) para fins de padronização. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

O percentual de oócitos em GV após 6h de cultivo não variou entre as 8 composições testadas no experimento. A média do grupo N50 ($94.98 \pm 1.76\%$, $p=0,5430$) foi numericamente maior dentre os tratamentos (Fig 2) e por isso escolhida para ser utilizada no experimento 2.

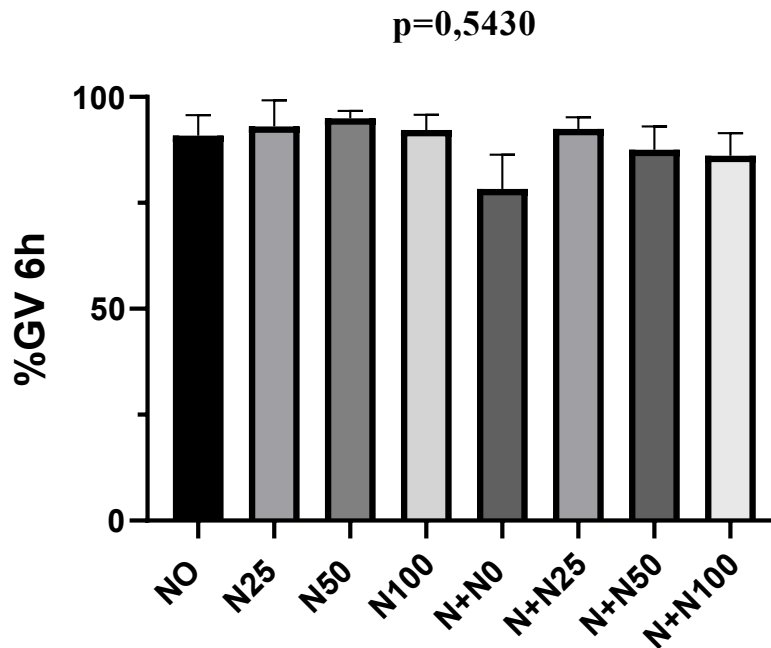


Figura 5. Efeitos da adição de NPPC em diferentes concentrações associadas a NRG1 ou não durante 6 horas de MIV.

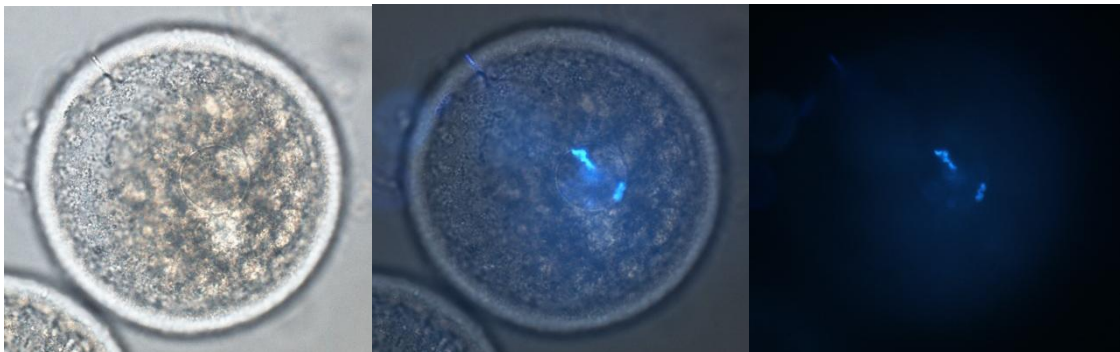


Figura 6. Imagens de microscópio com um oócito mostrando a GV corada pelo Hoechst 33342 na luz branca, luz branca + fluorescência e apenas fluorescência, respectivamente.

Ao analisar diferentes momentos da maturação no segundo experimento (8, 10 e 22 horas), observou-se que às 8 horas os grupos FSH ($54.63 \pm 6.67\%$) e Sequencial NPPC 6h ($50.92 \pm 7.40\%$) obtiveram resultados semelhantes em relação à GV, enquanto o Sequencial 6h ($19.58 \pm 5.96\%$, $p = 0.0034$) resultou numa taxa menor. Às 10 horas, a taxa de GVBD + MI foi menor no FSH ($59.84 \pm 7.40\%$) e similar entre o Sequencial 6h ($92.71 \pm 0.52\%$) e o Sequencial NPPC 6h ($90.68 \pm 3.20\%$, $p = 0.0002$).

Ao final da maturação, às 22 horas, não houve diferença significativa entre os tratamentos (FSH: $58.71 \pm 9.93\%$; Sequencial 6h: $74.88 \pm 3.77\%$; Sequencial NPPC 6h: $72.20 \pm 4.10\%$, $p = 0.2047$) (Fig 7).

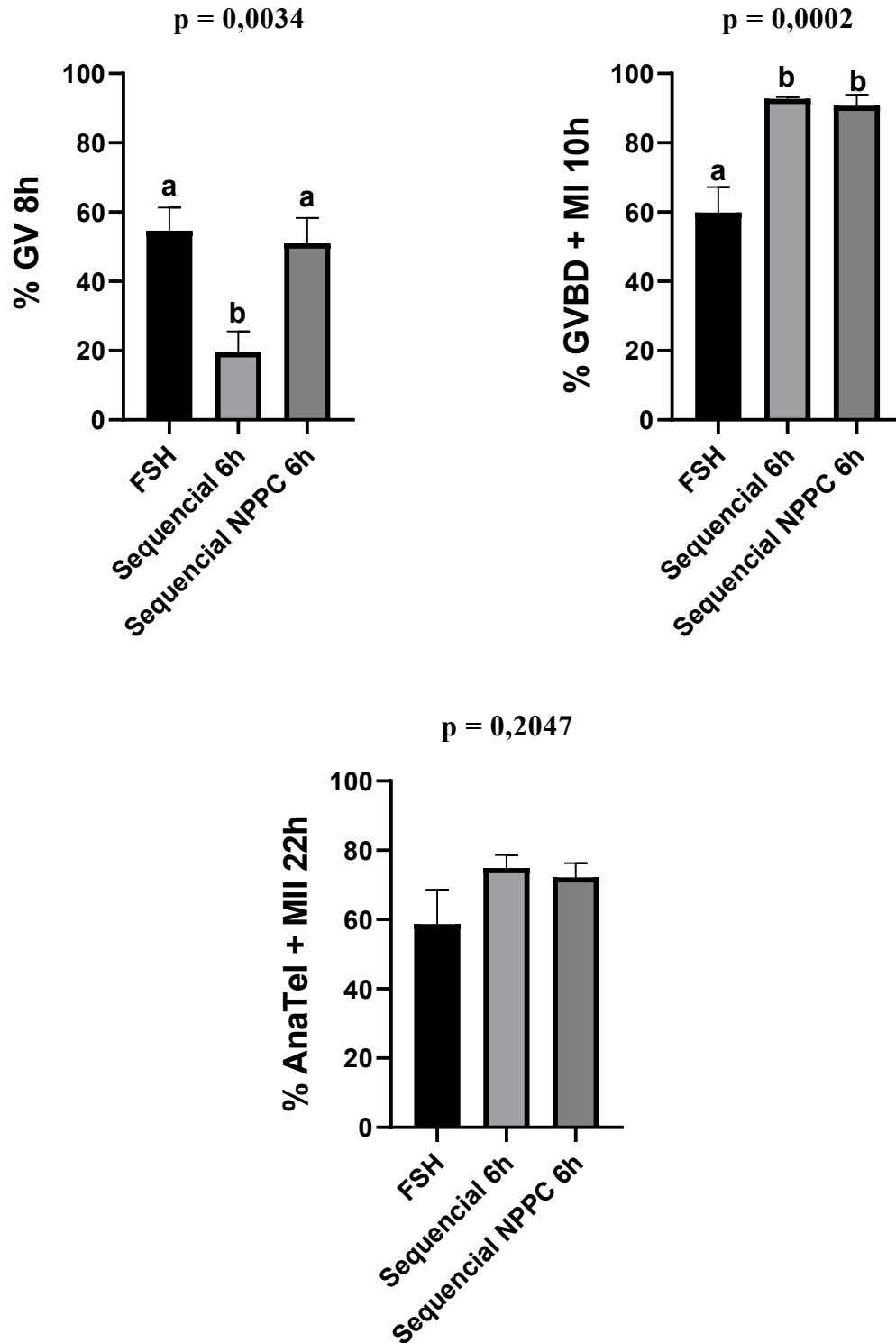
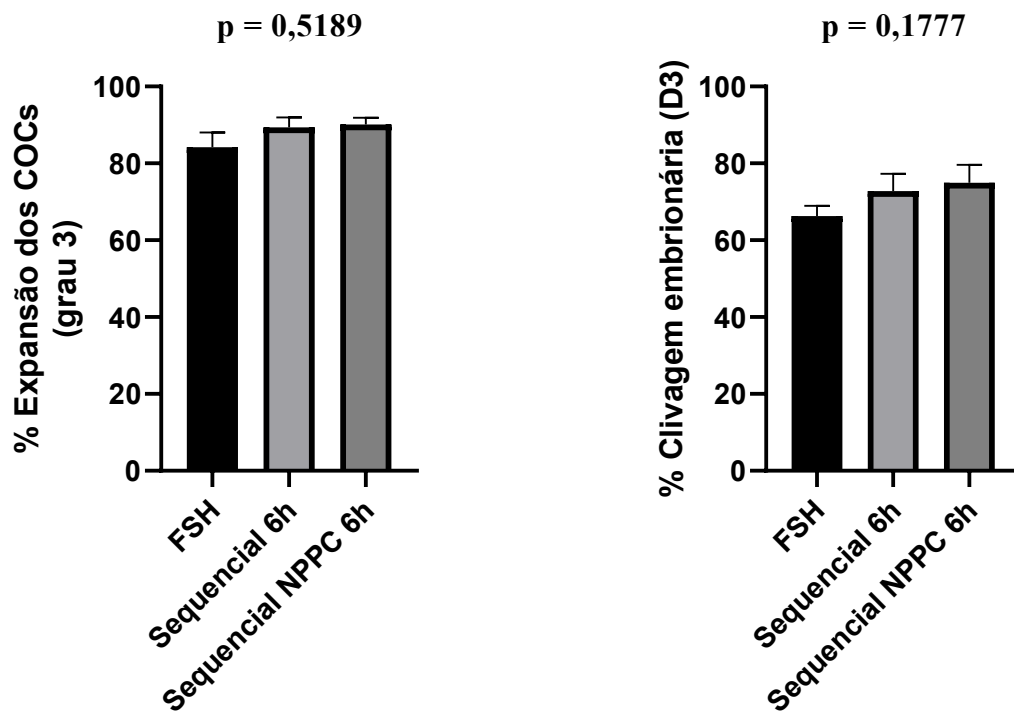


Figura 7. Análise da progressão meiótica oocitária ao final de 8, 10 e 22 horas de MIV nos grupos FSH, Sequencial 6h e Sequencial NPPC 6h.

No experimento 3 não foi constatada diferença estatística significativa no grau de expansão das CC dos COCs no momento da FIV (24h de MIV), assim como nas taxas de clivagem, de blastocistos, de embriões expandidos e eclodidos pelo total de oócitos e pelo total de embriões e nem na quantidade de células embrionárias totais. Os dados obtidos são representados graficamente na figura abaixo e apresentados detalhadamente, em porcentagem \pm erro padrão da média, na Tabela 1.



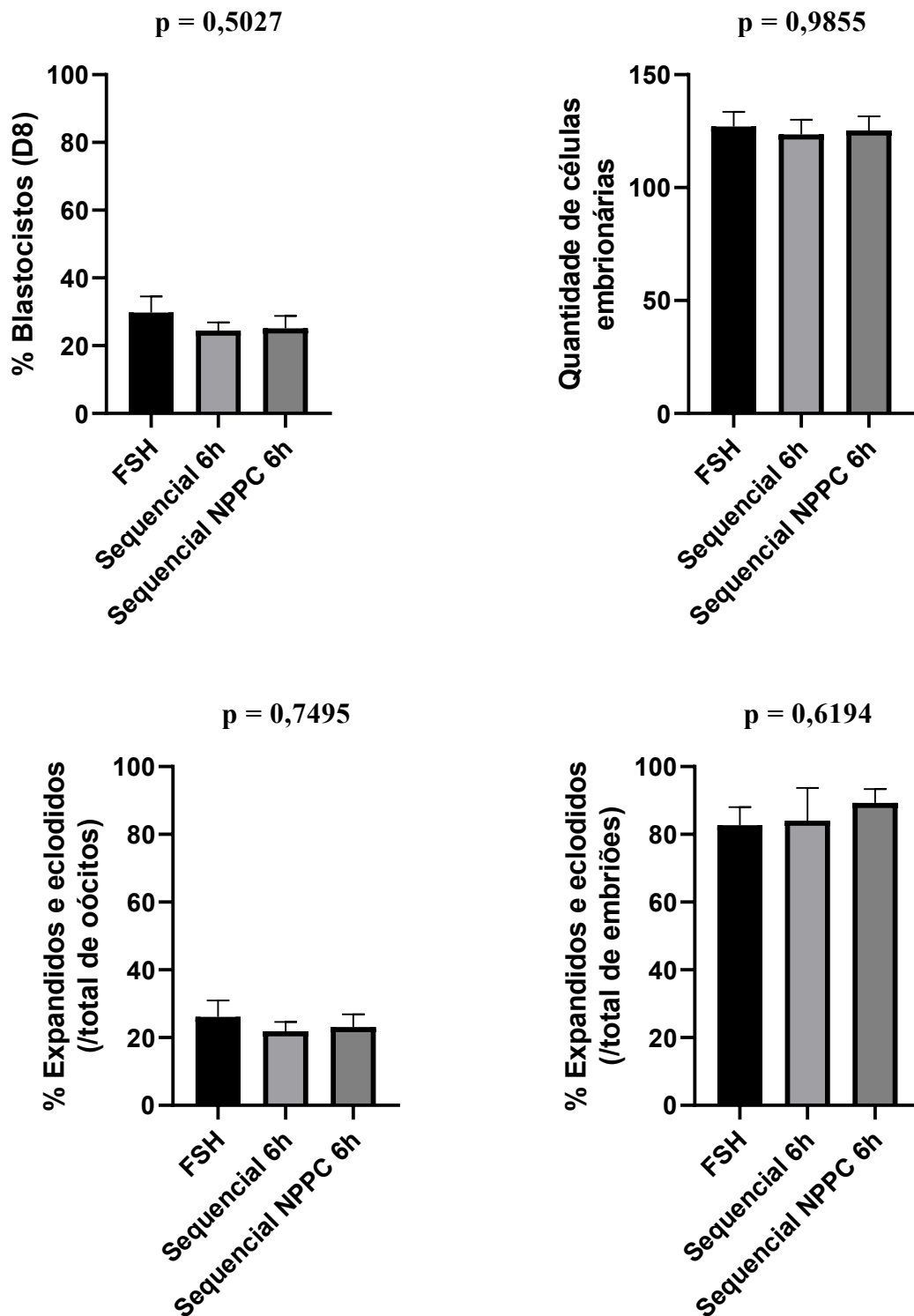


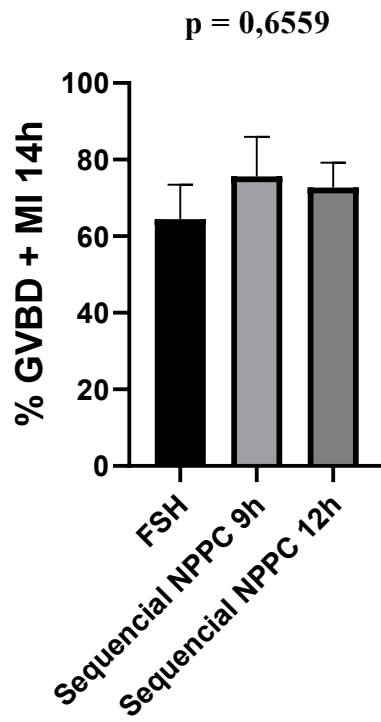
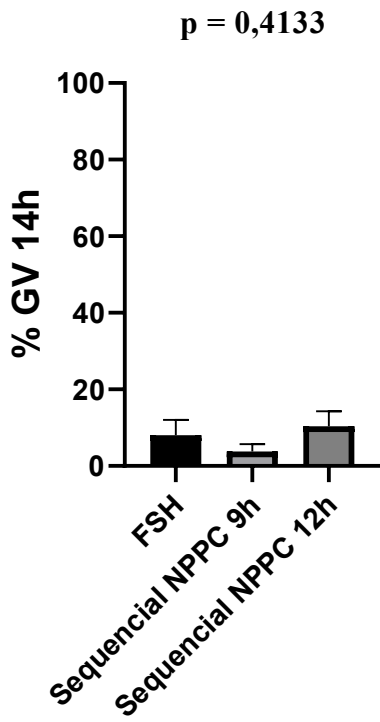
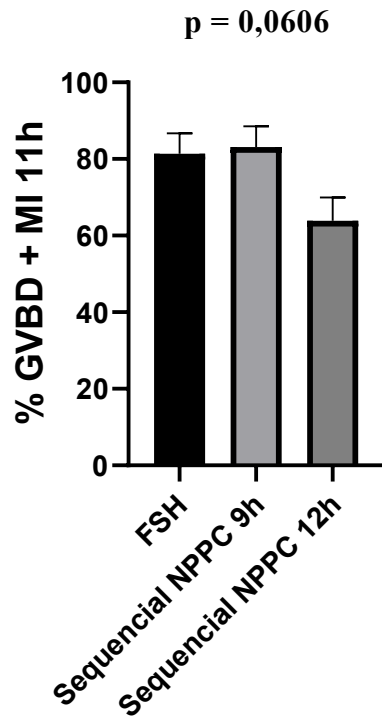
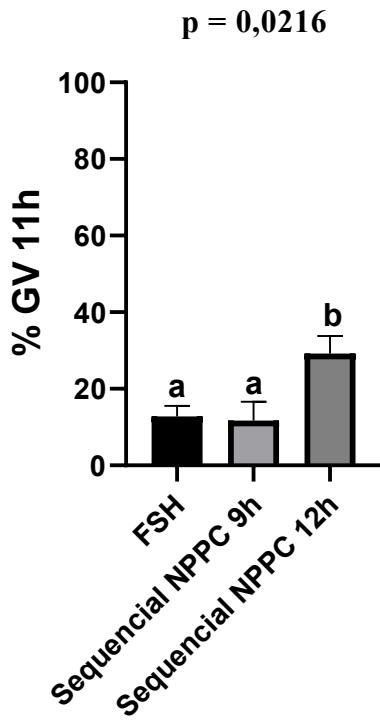
Figura 8. Impacto da adição de NPPC e da estimulação sequencial durante a MIV sobre a produção embrionária. **a)** Porcentagem de COCs que atingiram o grau 3 de expansão após 24 horas de MIV. **b)** Porcentagem de embriões clivados no D3 após a CIV. **c)** Porcentagem de blastocistos formados no D8 em relação ao total de oócitos cultivados. **d)** Número de células embrionárias totais no D8. **e)** Porcentagem de

blastocistos expandidos e eclodidos pelo total de oócitos no D8 **f)** Porcentagem de blastocistos expandidos e eclodidos pelo total de embriões formados no D8.

Grupo	FSH	Sequencial 6h	Sequencial NPPC 6h
Expansão COCs	(84.21 ± 3.82%)	(89.4 ± 2.51%)	(90.13 ± 1.74%)
Clivagem	(66.32 ± 2.61%)	(72.83 ± 4.48%)	(74.99 ± 4.65%)
Blastocistos	(29.8 ± 4.72%)	(24.48 ± 2.40%)	(25.16 ± 3.63%)
Células totais	(127.1 ± 6.52%)	(123.6 ± 6.47%)	(125.3 ± 6.23%)
Expandidos e eclodidos	(26.13 ± 4.84%)	(21.87 ± 2.78%)	(23.12 ± 3.73%)
/total oócitos			
Expandidos e eclodidos	(82.74 ± 5.27%)	(84.05 ± 9.62%)	(89.31 ± 4.07%)
/total embriões			

Tabela 1. Resultados em porcentagem referentes à produção embrionária realizada no terceiro experimento. Os dados são apresentados pela média ± erro padrão da média

No experimento 4, após 11 horas de maturação os grupos FSH (12.77 ± 2.8%) e Sequencial NPPC 9h (11.68 ± 4.92%) obtiveram resultados semelhantes em relação à GV, enquanto o Sequencial NPPC 12h (29.18 ± 4.64%, $p = 0.0216$) resultou numa taxa maior, diferenciando-se dos demais. Ao unir as taxas de GVBD e MI após 11 horas de MIV, houve uma tendência de diferença entre os grupos FSH (81.38 ± 5.35%) e Sequencial NPPC 9h (83.10 ± 5.43%) com o grupo Sequencial NPPC 12h (63.91 ± 6.03%, $p = 0,0606$). As taxas de AnaTel não foram consideradas, assim como a de degenerados. Já após 14 horas de maturação não houve diferença estatística significativa na taxa de GV entre os grupos FSH (8.00 ± 4.01%), Sequencial NPPC 9h (3.79 ± 1.94%) e Sequencial NPPC 12h (10.37 ± 3.94%, $p = 0.4133$), assim como nas taxas de GVBD + MI (FSH: 64.49 ± 8.99%; Sequencial NPPC 9h: 75.61 ± 10.31%; Sequencial NPPC 12h: 72.67 ± 6.52%, $p = 0.6559$) e de AnaTel (FSH: 16.74 ± 5.84%; Sequencial NPPC 9h: 17.54 ± 9.13%; Sequencial NPPC 12h: 13.08 ± 6.83%, $p = 0.8653$) (Fig 9).



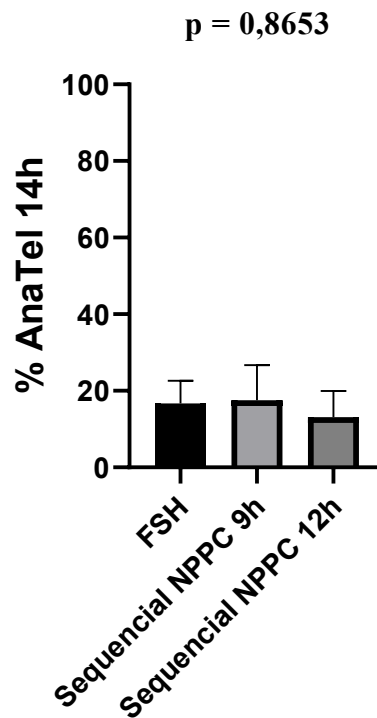


Figura 9. Efeitos do tratamento sequencial com NPPC utilizando diferentes durações das fases inicial e final (Sequencial NPPC 9h e Sequencial NPPC 12h) sobre a dinâmica da maturação nuclear às 11 e 14 horas de MIV.

5 DISCUSSÃO

A MIV de COCs bovinos é uma técnica de eficácia limitada essencial para a produção de embriões *in vitro*. Estudos anteriores com um sistema de cultivo em duas fases já foram realizados no intuito de prolongar a parada meiótica e favorecer a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática, e conseqüentemente, otimizar a produção embrionária (Buratini *et al.*, 2021, Gilchrist *et al.*, 2016). Na busca de um sistema de cultivo que permita maior competência oocitária e produção embrionária, nosso laboratório tem investigado a divisão da MIV em duas etapas. Este estudo teve como proposta ajustar a fase inicial da maturação utilizando referenciais fisiológicos para diminuir o descompasso entre as maturações nucleares e citoplasmáticas. Para isso, testamos os efeitos da suplementação com NPPC e NRG1 numa primeira etapa da maturação sobre a dinâmica da maturação nuclear e produção embrionária.

A NRG1 desempenha um papel fundamental na maturação oocitária ao ativar a via de sinalização e promover a cascata de maturação em sincronia com a AREG

(Conti & Franciosi, 2018; Richani *et al.*, 2013), contribuindo para sincronizar a maturação nuclear com a citoplasmática e garantir que o oócito esteja pronto para a fertilização no momento adequado. Acreditava-se que, além dessa função, a NRG1 poderia atuar de forma independente como um bloqueador da retomada meiótica precoce, prevenindo a maturação descoordenada. No entanto, os resultados obtidos após 6 horas de maturação não confirmam essa hipótese.

A presença de NRG1 no meio de maturação contendo diferentes doses de NPPC não alterou a dinâmica da maturação nuclear oocitária. A ausência de efeitos da adição da NRG1 pode ser decorrente de uma função moduladora apenas mediante estimulação da cascata de maturação com outros fatores EGF-like, conforme sugerido pela literatura (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014, Dellaqua *et al.*, 2023).

Já em relação aos grupos que continham apenas NPPC, a ausência de diferença estatística significativa sugere que todas as doses foram igualmente eficazes, indicando que o tempo de avaliação deveria ser estendido para melhor diferenciar seus efeitos. Ainda assim, o fato de todos os grupos permanecerem em GV sugere que, embora o bloqueio da maturação meiótica não tenha sido exclusivo do NPPC, este pode ter contribuído para reforçar ou prolongar esse bloqueio, o que corrobora estudos anteriores que indicam a importância dos níveis de NPPC na manutenção da parada meiótica pelo aumento de GMPc no oócito (Peng *et al.*, 2013; Franciosi *et al.*, 2014; Sanchez *et al.*, 2017) e o bloqueio eficiente da maturação nas primeiras horas é essencial para preservar a viabilidade e competência do oócito (Conti *et al.*, 2012).

A eficiência do NPPC em manter a vesícula germinativa por mais tempo também é observada ao se analisar os resultados obtidos após 8 horas de maturação, em que o grupo Sequencial 6h apresentou uma menor taxa de GV em comparação ao grupo Sequencial NPPC 6h. Esse resultado reforça o papel crucial do NPPC na prevenção da quebra da vesícula germinativa de forma precoce, ao retardar o avanço para a maturação nuclear e prolongar a fase de bloqueio meiótico.

Por outro lado, ao introduzir fatores como AREG e NRG1 após o período de 6 horas de maturação, observou-se uma ativação quase imediata da cascata de sinalização envolvida na maturação oocitária nos grupos Sequencial 6h e Sequencial NPPC 6h. Isso se reflete nas maiores taxas de GVBD e MI observadas após 10 horas quando comparados ao grupo FSH. Apesar do NPPC ter bloqueado a retomada meiótica nas 6 horas iniciais, a introdução desses fatores logo desencadeou a cascata de maturação. A AREG e a NRG1 são conhecidas por desencadear vias de

sinalização do EGFR, o que acelera a reentrada do oócito no ciclo meiótico e assim promove a maturação nuclear mais rapidamente (Park *et al.*, 2004; Richani *et al.*, 2013), o que de fato foi visto. Esses resultados sugerem então que, uma vez que esses fatores estão presentes no meio de cultivo, a maturação oocitária avança mais rapidamente do que quando o processo é conduzido apenas pelo FSH.

Ao final das 22 horas de cultivo, todos os grupos alcançaram de forma semelhante o estágio final da maturação nuclear, o que corrobora com estudos que dizem que uma vez ocorrida a quebra da vesícula germinativa, a maturação nuclear se completa em um período de 24-48 horas (Sirard *et al.*, 2006; Conti & Franciosi, 2018). Ainda que todos os tratamentos tenham atingido esse estágio de maturação nuclear, investigou-se a competência oocitária de cada grupo por meio da análise da produção embrionária, permitindo uma avaliação mais detalhada sobre o impacto de cada protocolo na qualidade e no potencial de desenvolvimento dos oócitos.

A análise dos dados de produção embrionária não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos quanto às taxas expansão das CC dos COCs, de clivagem, formação de blastocistos, quantidade total de células embrionárias e taxas de embriões expandidos e eclodidos, tanto em relação ao total de oócitos como de embriões, indicando efeitos semelhantes no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

Ainda que não se tenha observado diferenças estatísticas, houve tendência numérica de maior expansão das CC e clivagem nos grupos Sequencial 6h e Sequencial NPPC 6h, possivelmente devido à ação sinérgica de AREG e NRG1 na expansão das CC durante a maturação oocitária. Por outro lado, o grupo FSH apresentou tendência a maiores taxas de blastocistos, sugerindo que a maturação contínua também garante boa competência oocitária e suporte eficiente para o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Sirard *et al.*, 2006; Richani & Gilchrist, 2018). Essas observações indicam que ajustes no tempo de exposição ao protocolo sequencial poderiam potencializar tanto a expansão inicial das CC quanto o desenvolvimento embrionário final.

Além disso, o fato de ambos os tratamentos terem apresentado uma produção embrionária similar à do FSH permite a consideração de alternativas mais fisiológicas, minimizando possíveis impactos negativos do uso prolongado de FSH na viabilidade e qualidade embrionária a longo prazo (Conti & Franciosi, 2018; Richani & Gilchrist, 2018). A introdução do NPPC, em particular, ao atuar na manutenção da parada

meiótica, reforça a possibilidade de otimizar os protocolos de MIV, e, com isso, o experimento 4 surgiu como uma tentativa de otimização ao avaliar o efeito da extensão do tempo de exposição ao NPPC na primeira fase do cultivo bifásico.

Os resultados obtidos após 11 horas de MIV demonstraram que o uso do meio contendo NPPC por 12 horas (Sequencial NPPC 12h) promoveu maior porcentagem de oócitos em estágio de GV quando comparado ao FSH e ao grupo exposto por 9 horas. É importante ressaltar que, no experimento 2, os grupos Sequencial 6h e Sequencial NPPC 6h após 10 horas de cultivo apresentaram taxas de GVBD + MI superiores a 90%, enquanto no experimento 4, tanto o grupo Sequencial NPPC 9h ($83.10 \pm 5.43\%$) quanto o Sequencial NPPC 12h ($63.91 \pm 6.03\%$) tiveram taxas de GVBD + MI menores, com tendência à diferença estatística entre eles, o que sugere que prolongar o tempo de exposição ao NPPC foi eficiente no bloqueio da retomada meiótica, principalmente no grupo Sequencial NPPC 12h.

Após 14 horas, no entanto, as diferenças entre os grupos testados não foram significativas, o que pode indicar que o bloqueio conferido pelo NPPC atinge um limite, levando à retomada espontânea da meiose, ou ainda que, assim como observado no experimento 2, a introdução da AREG e da NRG1 promove a retomada quase espontânea da meiose, e essa hipótese pode justificar a taxa de GVBD + MI do grupo Sequencial NPPC 12h estar semelhante aos demais grupos.

Ainda assim, o tempo de exposição ao NPPC se confirma como um fator crucial no desenvolvimento de protocolos bifásicos. Neste estudo, os efeitos do protocolo sequencial com exposições de 9 e 12 horas ao NPPC sobre a produção embrionária não foram avaliados devido aos limites temporais do mestrado. No entanto, a extensão do cultivo por um período de 12 horas pode representar uma estratégia promissora para melhorar a qualidade oocitária e aprimorar o desenvolvimento embrionário.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados sugerem que o cultivo sequencial, com uma fase inicial suplementada com NPPC e sem ativação da cascata ovulatória, seguida da adição de AREG e NRG1 após cerca de 12 horas, pode representar uma estratégia válida para modular a maturação nuclear e proporcionar melhor sincronia com a maturação citoplasmática e molecular, favorecendo a competência oocitária e,

conseqüentemente, a produção de embriões *in vitro*. Estudos adicionais são ainda necessários para avaliar essa possibilidade.

REFERÊNCIAS

ABASSI, L.; EL-HAYEK, S.; CARVALHO, KF.; WANG, W.; YANG, Q. Granados-Aparici S, Mondadori R, Bordignon V, Clarke HJ. Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular compartment at ovulation. *Nat Commun*;12: 01-13, 2021.

ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 382, n. 1, p. 480-487, 2014.

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 121, p. 647–653, 2001.

ALBERTINI, D.F.; SANFINS, A.; COMBELLES, C.M. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online*, Jun;6(4):410-5, 2003.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod* 37:335–44, 1994.

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

BARROS, RG.; LIMA, PF.; SOARES, ACS.; SANCHES, L.; PRICE, CA.; BURATINI, J. Fibroblast growth factor 2 regulates cumulus differentiation under the control of the oocyte. *J Assist Reprod Genet*, 36: 905-913, 2019.

BURATINI, J.; DELLAQUA, T.T.; DAL CANTO, M.; LA MARCA, A. et al. The putative roles of FSH and AMH in the regulation of oocyte developmental competence: from fertility prognosis to mechanisms underlying age-related subfertility. *Human Reproduction Update*, v. 28, p. 232-254, 2021.

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

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

CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F.; MEHATS, C.; CHUN, S. Y.; HORNER, K.; JIN, C. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 187, n. 1-2, p. 153-159, 2002.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 356, n. 1-2, p. 65-73, 2012.

CONTI, M.; FRANCIOSI, F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: Integrated nuclear and cytoplasmic events. *Human Reproduction Update*, 24(3), 245-266, 2018.

DELLAQUA, T.T.; VIGARO, R.A.; JANINI, L.C.Z.; DAL CANTO, M. et al. Neuregulin 1 (NRG1) modulates oocyte nuclear maturation during IVM and improves post-IVF embryo development. *Theriogenology*, v. 195, p. 209-216, 2023.

DOWNS, S. M. Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 77, n. 8, p. 566-585, 2010.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; SARDET, C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev Biol*. Apr;17(2):314-23, 2006.

EDWARDS, R. G. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet*, v. 286, n. 7340, p. 926-929, 1965.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, v. 54, n. 1, p. 197-207, 1996.

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

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, S.C.; FADINI, R.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M.M.; ALBERTINI, D.F.; LUCIANO, A.M. Natriuretic Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. *Biology of Reproduction*, 91(3): 61, p1-9, 2014.

FREIMANN, S.; BEN-AMI, I.; DANTES, A.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in

human ovarian follicular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 324, p. 829-834, 2004.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, p. 836-848, 2009.

GARCIA, J. M.; DE LIMA, V. F. H.; PINHEIRO, L. E. L.; MIKICH, A. B.; ALMEIDA JUNIOR, I. L. Estudos com maturação "in vitro" de oócitos bovinos em meios quimicamente definidos. *Ars Veterinaria*, v. 4, n. 1, p. 69-75, 1988.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte–follicle interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 1, 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, n. 2, 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.

HAGHIGHAT, N.; VAN WINKLE, L. J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *Journal of Experimental Zoology*, v. 253, p. 71–82, 1990.

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

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

HYTELL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. *Embriologia veterinária*, Elsevier, p 66-97, 2012.

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

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

LEEMANS, B.; GADELLA, BM.; STOUT, TA.; DE SCHAUWER, C.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Why doesn't conventional IVF work in the horse?

The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*, 152: R233-R245, 2016.

LODDE, V.; COLLEONI, S.; TESSARO, I.; CORBANI, D.; LAZZARI, G.; LUCIANO, AM.; GALLI, C.; FRANCIOSI, F. A prematuration approach to equine IVM: considering cumulus morphology, seasonality, follicle of origin, gap junction coupling and large-scale chromatin configuration in the germinal vesicle. *Reprod Fertil Dev*, 31: 1793-1804, 2019.

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

LUCIANO, A.M.; Lodde, V. Changes of large-scale chromatin configuration during mammalian oocyte differentiation Oogenesis. Springer, pp. 93-108, 2013.

MACHALKOVA, J.; KRAUSOVA, K.; JOSEKOVA, E.; TOMANEK, M. Development of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, 61: 329-335, 2004.

MACAULAY, A.D.; GILBERT, I.; CABALLERO, J.; BARRETO, R. et al. The gametic synapse: RNA 1010 transfer to the bovine oocyte. *Biol Reprod*, v. 91, p. 90, 2014. 1011

MALHOTRA, V.; SERAFINI, T.; ORCI, L.; SHEPHERD, J. C.; ROTHMAN, J. E. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*, v. 58, n. 2, p. 329-336, 1989.

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.

MARTINEZ, CA.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; MASIDE, C.; RAMIS, G.; CAMBRA, JM.; VAZQUEZ, JM.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GIL, MA.; MARTINEZ, EA. Exogenous Melatonin in the Culture Medium Does Not Affect the Development of In Vivo-Derived Pig Embryos but Substantially Improves the Quality of In Vitro-Produced Embryos. *Antioxidants (Basel)*, 11, 2022.

MEHLMANN, L. M. Oocyte-specific expression of GPR3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Developmental Biology*, v. 288, n. 2, p. 397-404, 2005.

MIKICH, A. B.; WATANABE, Y. F.; LAICINI, E. M.; MENCK, M. C. L.; LOBO, R. B. Resultados preliminares sobre a maturação e fecundação "in vitro" de oócitos foliculares bovinos. *Anais do Encontro de Pesquisas Veterinárias, Jaboticabal, SP*, 1989.

MORRIS, LHA. The development of in vitro embryo production in the horse. *Equine Vet J*, 50: 712- 720, 2018.

MUGGLETON-HARRIS, A. L.; BROWN, J. J. Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. *Human Reproduction*, v. 3, n. 8, p. 1020-1028, 1988.

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.

NORRIS, R. P.; RATZAN, W.J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L.M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M.A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V.O.; JAFFE, L.A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 136, 1869-1878, 2009.

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

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

PENG, J. Y.; XIN, H. Y.; HAN, P.; ZHAO, H. B.; BAI, L.; AN, X. P. Identification and gene expression analyses of natriuretic peptide system in the ovary of goat (*Capra hircus*). *Gene*, v. 524, p. 105-113, 2013.

PINCUS G.; ENZMANN E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. The activation of ovarian eggs. *The journal of Experimental Medicine*, 62: 655-675, 1935.

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.

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

ROBINSON, J.W.; ZHANG, M.; SHUHAIBAR, L.C.; NORRIS, R.P; GEERTS, A.; WUNDER, F. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol*, 366:308-16, 2012.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1822, n. 12, p. 1896-1912, 2012.

SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, J.; REES, J. Effect of cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate modulators on human oocyte maturation. *Human Reproduction*, v. 32, n. 9, p. 2024-2034, 2017.

SATHANANTHAN, A. H.; TROUNSON, A. O. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Human Reproduction*, v. 15, n. 2, p. 148159, 2000.

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.

SIRARD, M. A., RICHARD F., BLONDIN P., ROBERT C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136, 2006.

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.

SUN, Q. Y.; SCHATTEH, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, v. 131, 2006.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental competence. *Reproduction*, v. 126, n. 2, p. 225-237, 2003.

THIBIER, M. Reproductive biotechnologies in animal production: progresses and constraints. *Animal Reproduction Science*, v. 85, n. 1-2, p. 113-123, 2006.

VACCARI, S.; HORNER, K.; MEHATS, C.; FANTUZZI, G.; CONTI, M. P. Defining the roles of cyclic AMP and the epidermal growth factor receptor in the ovulatory process in vivo. *Molecular Endocrinology*, v. 23, n. 6, p. 829-841, 2009.

WARD, F. H. Advances in equine embryo culture. *Equine Veterinary Journal*, v. 26, p. 110-115, 1994.

WRIGHT, J. M. Appendix D. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In: INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. *IETS Manual*. 4. ed., 2010.

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

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

ZHANG, Y.; WANG, H.; LIU, W.; YANG, Y.; WANG, X.; ZHANG, Z.; GUO, Q.; WANG, C.; XIA, G. Natriuretic peptides improve the developmental competence of in vitro cultured porcine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, May 30;15(1):41, 2017.

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