

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Dissertação será disponibilizado
somente a partir de 01/12/22.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

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

Thaisy Tino Dellaqua

Botucatu – SP

2021

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de Botucatu

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

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

Thaisy Tino Dellaqua

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

Orientador: Prof. Dr. José Buratini

Coorientador: Prof. Dr. Alberto Maria Luciano

Botucatu – SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dellaqua, Thaisy Tino.

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

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

Orientador: José Buratini

Coorientador: Alberto Maria Luciano

Capes: 50504002

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

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

THAISY TINO DELLAQUA

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

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Buratini

Presidente e orientador

Departamento de Biologia Funcional e Estrutural – IB/UNESP Botucatu

Profa. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes

Membro titular

Departamento de Ciências Biológicas – UNIFESP Diadema

Profa. Dra. Fernanda Landim

Membro titular

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

Botucatu – SP

2021

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Albert Einstein

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

HAS2 = hialurona sintase 2

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

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

LH = hormônio luteinizante

LHR = receptor de LH

MAPK = proteína quinase ativada por mitógenos

MGC = células da granulosa mural

MI = metáfase I

MII = metáfase II

MIV = maturação *in vitro*

MPF = fator promotor da maturação

mtDNA = ácido desoxirribonucleico mitocondrial

mRNA = ácido ribonucleico mensageiro

N₂ = nitrogênio

NaCl = cloreto de sódio

NPPC = peptídeo natriurético tipo C

NPR2 = receptor peptídeo natriurético tipo 2

NRG1-4 = neuroregulina 1-4

O₂ = oxigênio

OSF = fatores secretados pelo oócito

PBS = tampão fosfato-salina

PDE3A = fosfodiesterase do tipo 3A

PG = prostaglandinas

PGE2 = prostaglandina E2

PIV = produção *in vitro* de embriões

PKA = proteína quinase A

PKC = proteína quinase C

PTGS2 = prostaglandina sintetase 2

PTX3 = pentraxina 3

RNA = ácido ribonucleico

SF = sistema folicular

TGF α = fator de crescimento transformador- α

TNFAIP6 = fator de necrose tumoral 6

TZP = projeções transzonais

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

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

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

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

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

Capítulo II

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

912 **Referências**

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

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

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

1036 Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, Saadi HA, Gagne D, Sirard MA,
1037 Khandjian EW *et al.* Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation.
1038 *Biol Reprod* 2016;**94**: 16.

1039 Machado MF, Caixeta ES, Sudiman J, Gilchrist RB, Thompson JG, Lima PF, Price CA, Buratini J.
1040 Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve
1041 quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 2015;**84**: 390-398.

1042 Machado MF, Portela VM, Price CA, Costa IB, Ripamonte P, Amorim RL, Buratini J, Jr. Regulation and
1043 action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *J Endocrinol* 2009;**202**: 347-353.

1044 Mao J, Whitworth KM, Spate LD, Walters EM, Zhao J, Prather RS. Regulation of oocyte mitochondrial
1045 DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during in vitro maturation affects embryo
1046 development in pigs. *Theriogenology* 2012;**78**: 887-897.

1047 Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of
1048 meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005;**130**: 791-799.

1049 Meinecke B, Janas U, Podhajsky E, Meinecke-Tillmann S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine
1050 oocytes following protein synthesis inhibition. *Reproduction in Domestic Animals* 2001;**36**: 183-188.

1051 Meran S, Luo DD, Simpson R, Martin J, Wells A, Steadman R, Phillips AO. Hyaluronan facilitates
1052 transforming growth factor-beta1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor
1053 interaction. *J Biol Chem* 2011;**286**: 17618-17630.

1054 Millar JB, Russell P. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 1992;**68**:
1055 407-410.

1056 Noma N, Kawashima I, Fan HY, Fujita Y, Kawai T, Tomoda Y, Mihara T, Richards JS, Shimada M. LH-
1057 induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte
1058 maturation. *Mol Endocrinol* 2011;**25**: 104-116.

1059 Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA.
1060 Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap
1061 junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 2008;**135**: 3229-
1062 3238.

1063 Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action
1064 in the ovulatory follicle. *Science* 2004;**303**: 682-684.

1065 Pincus G, Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The
1066 Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* 1935;**62**: 665-675.

1067 Prochazka R, Blaha M, Nemcova L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced
1068 meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* 2012;**144**: 535-546.

1069 Prochazka R, Nemcova L. Mechanisms of FSH- and Amphiregulin-Induced MAP Kinase 3/1 Activation
1070 in Pig Cumulus-Oocyte Complexes During Maturation In Vitro. *Int J Mol Sci* 2019;**20**: 1-13.

1071 Prochazka R, Petlach M, Nagyova E, Nemcova L. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig
1072 cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro:
1073 comparison with gonadotropins. *Reproduction* 2011;**141**: 425-435.

1074 Richani D, Dunning KR, Thompson JG, Gilchrist RB. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus
1075 cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Hum Reprod Update* 2021;**27**: 27-
1076 47.

1077 Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and
1078 developmental competence. *Hum Reprod Update* 2018;**24**: 1-14.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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