

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO SEQUENCIAL E SUPLEMENTAÇÃO COM  
NEURORREGULINA DURANTE A MIV SOBRE A PROGRESSÃO MEIÓTICA E  
PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA**

**DRIELLE DOS SANTOS CARNEIRO**

**Botucatu, SP**

**2023**

**DRIELLE DOS SANTOS CARNEIRO**

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO SEQUENCIAL E SUPLEMENTAÇÃO COM  
NEURORREGULINA DURANTE A MIV SOBRE A PROGRESSÃO MEIÓTICA E  
PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biotecnologia de Botucatu da  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita  
Filho", para a obtenção do grau de bacharel em  
Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. José Buratini Júnior

Coorientadora: MSc. Thaisy Tino Dellaqua

**Botucatu, SP**

**2023**

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Carneiro, Drielle dos Santos.

Efeitos da estimulação sequencial e suplementação com neurorregulina durante a MIV sobre a progressão meiótica e a produção embrionária / Drielle dos Santos Carneiro. - Botucatu, 2023

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

Orientador: José Buratini Júnior

Coorientador: Thaisy Tino Dellaqua

Capes: 50504002

1. Anfirregulina. 2. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 3. Neurregulinas. 4. Embriões - Técnicas *In Vitro*.

Palavras-chave: AREG; Maturação *in vitro*; NRGl; PIVE; Vesícula germinativa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Joaquim e Francisca, que trabalharam muito para proporcionar o melhor, especialmente nos estudos, para mim e para minhas irmãs. Por todo o apoio que me deram durante essa trajetória e sempre que precisei, por me estimularem a acreditar em mim mesma e por sempre confiarem no que meu coração decide. Agradeço a minhas irmãs, Daiane e Daniele por sempre entenderem o que eu sinto, por conselhos todas às vezes que eu precisei, por estarem presentes para mim em absolutamente toda e qualquer situação, sempre me apoiando, me acolhendo e me incentivando. Aos meus tios, Lujivan e Cida, e meus primos Rei e Emilly, pelo apoio e por sempre me proporcionarem momentos felizes.

Agradeço ao Heitor, meu sobrinho pequenino, que é uma luz e alegria na minha vida, traz o melhor de mim sempre, foi o melhor companheiro e me trouxe muita força durante a pandemia em 2020 e 2021, e mesmo sendo pequeno, me acolhe, me abraça e sempre sabe o que dizer, como um “vai ficar tudo bem” ou “vai descansar, tia”. Agradeço a Heleninha, que ainda não nasceu, mas já é uma fonte de alegria e força para mim.

Aos meus amigos que o estágio em Citopatologia no HCFMB me proporcionou, Camila, Camilla e Bruno, pela rotina mais divertida, por todos os momentos juntos e pelo apoio nesses últimos meses. Aos meus amigos da vida Mariana, Marcela, Lívia Soares, Rebeca, Thaís e Wallace, por me acompanharem a alguns bons anos, sempre torcendo por mim e me proporcionando momentos incríveis. Às pessoas incríveis que Botucatu me proporcionou conhecer e, em especial: Carol, por todas as risadas e momentos, Julia, por todo o cuidado e amor, Marina, por todos os momentos que compartilhamos, especialmente na pandemia, e pelos sermões, Giovanna, pela calma e aconchego, e Lívia Nagoaka, minha roommate para sempre, que trouxe alegria e apoio todos os dias e por dividir o mesmo neurônio comigo.

Agradeço ao meu orientador, Dr. José Buratini, pelo apoio nesse processo final da graduação e pela grande oportunidade em fazer parte do Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana, um lugar em que eu aprendi e me desenvolvi muito. Às minhas companheiras e amigas de laboratório, pelo acolhimento e por todos os momentos de aprendizado, rotina, risadas e comidas, Ana Caroline, Carolina, Mariana, Nathalia e, em especial, a Thaisy, minha coorientadora, por me ensinar e me ajudar sempre, inclusive nos meus momentos emotivos.

Agradeço à FAPESP, pelo auxílio (2019/14588-6) que proporcionou a realização dos experimentos deste trabalho, à Unesp, por ser uma instituição pública que me proporcionou ensino, extensão e pesquisa com qualidade e gratuitamente e me permitir a vir para Botucatu e viver tantas experiências.

## RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica de reprodução assistida empregada na pecuária e na medicina reprodutiva. O uso de fatores intrafoliculares durante a MIV tem sido investigado para estimular e modular a cascata de maturação de maneira mais fisiológica e melhorar os resultados da produção embrionária. Esse estudo teve como objetivo aprimorar um sistema de maturação oocitária já estabelecido em nosso laboratório, o Sistema Folicular (SF), utilizando os indutores FSH e ampirregulina (AREG) de maneira sequencial (SFseq), para promover uma ativação mais fisiológica da cascata de maturação. Avaliou-se também a suplementação com neurorregulina (NRG1) na primeira etapa do SFseq, um EGF-like que atua modulando a ativação da cascata de maturação. Complexos *cumulus*-oócitos (COCs) obtidos de ovários de abatedouros foram submetidos a MIV durante 6, 9 e 22h para avaliar a maturação nuclear (experimento 1) ou durante 24h para a produção embrionária (experimento 2) com os tratamentos: FSH, SF, SFseq e SFseq+N. COCs alocados no grupo SFseq e SFseq+N foram primeiramente cultivados por 6h em meio sem adição de AREG e NRG1 (SFseq) ou somente sem adição de AREG (SFseq+N), seguido de cultivo em meio SF completo. No experimento 1, ao final dos períodos estipulados acima, os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst para avaliar a progressão meiótica. No experimento 2, os COCs maturados foram submetidos à fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro*. No terceiro dia do cultivo, a clivagem embrionária foi analisada e ao final de 7 dias de cultivo, a produção de blastocistos, o grau de desenvolvimento e número de células embrionárias foram analisados. Os dados foram comparados por ANOVA ou Kruskal-Wallis e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . Os resultados mostraram que a ativação sequencial (SFseq e SFseq+N) modulou a maturação nuclear nas primeiras 6 horas sem comprometer a progressão para metáfase II. Quanto à produção embrionária, a adição de NRG1 nas fases iniciais do tratamento SFseq reduziu a taxa de blastocisto. No entanto, não houve diferenças no número total de células nos blastocistos produzidos. Os dados indicam que a estratégia sequencial diminuiu a velocidade de maturação nuclear inicial, mas parece não beneficiar a aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário no modelo proposto. A continuidade dos estudos, com maior número de réplicas experimentais, é importante para a confirmação desses resultados, considerando também a avaliação de variações no tempo de exposição aos tratamentos e do período total da maturação.

**Palavras-chave:** maturação oocitária *in vitro*, AREG, NRG1, vesícula germinativa, PIVE

## ABSTRACT

*In vitro* maturation (IVM) is an assisted reproduction technique used in livestock and reproductive medicine. The use of intrafollicular factors during IVM has been investigated to stimulate and modulate the maturation cascade in a more physiological way and improve embryo production outcomes. This study aimed to improve an oocyte maturation system already established in our laboratory, the Follicular System (FS), using the FSH and amphirregulin (AREG) inducers in a sequential manner (SFseq), to promote a more physiological activation of the maturation cascade. Supplementation with neuregulin (NRG1) in the first stage of SFseq, an EGF-like that acts by modulating the activation of the maturation cascade, was also evaluated. Cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained from slaughterhouse ovaries were submitted to IVM for 6, 9 and 22 h to evaluate nuclear maturation (experiment 1) or for 24 h for embryo production (experiment 2) with the following treatments: FSH, SF, SFseq and SFseq+N. COCs allocated to the SFseq and SFseq+N groups were first cultured for 6 h in medium without the addition of AREG and NRG1 (SFseq) or only without the addition of AREG (SFseq+N), followed by culture in complete SF medium. In experiment 1, at the end of the periods stipulated above, the oocytes were denuded and stained with Hoechst to evaluate meiotic progression. In experiment 2, the matured COCs were submitted to *in vitro* fertilization and *in vitro* culture. On the third day of culture, embryo cleavage was analyzed and, at the end of 7 days of culture, blastocyst production, degree of development and number of embryo cells were analyzed. Data were compared by ANOVA or Kruskal-Wallis and the differences were considered significant when  $P \leq 0.05$ . The results showed that sequential activation (SFseq and SFseq+N) modulated nuclear maturation in the first 6 hours without compromising progression to metaphase II. However, there were no differences in the total number of cells in the blastocysts produced. The data indicate that the sequential strategy decreased the initial nuclear maturation rate, but does not seem to benefit the acquisition of competence for embryonic development in the proposed model. The continuity of the studies, with a greater number of experimental replicates, is important for the confirmation of these results, also considering the evaluation of variations in the time of exposure to the treatments and the total period of maturation.

**Keywords:** *in vitro* maturation, AREG, NRG1, FSH, germinal vesicle.

## SUMÁRIO

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                          | 7  |
| 2. OBJETIVO .....                                                            | 12 |
| 3. METODOLOGIA .....                                                         | 12 |
| 3.1. Delineamento experimental .....                                         | 12 |
| 3.2. Obtenção dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos (COCs) post mortem ..... | 14 |
| 3.3. Maturação oocitária <i>in vitro</i> (MIV) .....                         | 15 |
| 3.4. Análise da progressão meiótica .....                                    | 15 |
| 3.5. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e cultivo <i>in vitro</i> (CIV) .....  | 15 |
| 3.6. Análise embrionária .....                                               | 16 |
| 3.7. Análise estatística .....                                               | 17 |
| 4. RESULTADOS .....                                                          | 17 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                           | 20 |
| 6. CONCLUSÃO .....                                                           | 24 |
| REFERÊNCIAS .....                                                            | 25 |

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior número de recém-nascidos frutos de fertilização *in vitro* (FIV), inseminação artificial e transferência de embriões entre os países da América Latina (Zegers-Hochschild *et al*, 2023) e os dados coletados pelo Sistema Nacional de Produção de Embriões da Anvisa nos últimos anos evidenciam que os procedimentos de reprodução humana assistida estão em crescimento. A FIV é uma das técnicas de reprodução assistida mais promissoras para casais com problemas de infertilidade, cujas causas incluem subfertilidade masculina, diminuição da reserva ovariana, disfunção ovulatória, endometriose e infertilidade de causa inexplicada, (Huang and Rosenwaks, 2012). Geralmente o procedimento é precedido por estimulação ovariana como o uso de gonadotrofinas, bem como agonistas e/ou antagonistas de GnRH, de modo a promover o desenvolvimento folicular sem que ocorra uma ovulação antecipada (von Wolff, 2019), a fim de aumentar a quantidade de folículos ovarianos para a aspiração folicular (Corleta, 2010). Em seguida, a administração de hCG ou de LHr é realizada para promover a elevação em onda do LH, essencial para que o oócito tenha a meiose retomada e atinja metáfase II da meiose I (Corleta, 2010). Após a punção folicular, os oócitos recuperados, predominantemente maduros, são submetidos à FIV clássica (cultivo com os espermatozoides selecionados) ou ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide) e posteriormente ao cultivo embrionário. O procedimento é finalizado com a transferência de um ou dois embriões resultantes para o útero da mulher após 2-3 dias de cultivo embrionário, na fase de clivagem, ou após 5-6 dias de cultivo, na fase de blastocisto (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2013). Outra possibilidade é de realizar a criopreservação desses oócitos ou dos embriões produzidos para posterior transferência (Iussig *et al*, 2019).

Outra técnica da reprodução assistida é a maturação oocitária *in vitro* (MIV), que consiste na coleta de complexos *cumulus*-oócito (COCs) em seus estados imaturos, provenientes de ovários não estimulados ou minimamente estimulados, para então serem maturados *in vitro* até o estágio adequado para a fertilização (Gilchrist *et al*, 2016, Buratini *et al*, 2021). Na pecuária, a MIV é amplamente aplicada, sendo parte do protocolo padrão para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). A PIVE vem crescendo dramaticamente, com destaque na espécie bovina, tendo cerca de 100 000 animais nascidos por ano (Perry, G., 2014). Em 2021, foram mais de 1,5 milhão de embriões produzidos através da PIVE (Viana, 2022).

Na medicina humana, desde 1991, quando o primeiro nascimento a partir de oócitos imaturos e a MIV foram reportados (Cha *et al.* 1991), mais de 5000 nascidos vivos resultantes desta técnica foram registrados (Sauerbrun-Cutler *et al.*, 2015). Esses números mostram que a MIV ainda não é comumente aplicada na reprodução humana quando comparada a reprodução animal. Apesar disso, atualmente, a MIV tem sido proposta como um procedimento alternativo frente aos riscos dos protocolos de estimulação ovariana desencadearem a síndrome da hiperestimulação ovariana (SHO), podendo causar quadros de tromboembolismo, insuficiência renal, síndrome de dificuldade respiratória aguda e outras complicações (Huang and Rosenwaks, 2014). Mulheres com síndrome de ovário policístico estão mais suscetíveis a essa condição (Chen *et al.*, 2012; Coticchio *et al.*, 2012, Huang & Rosenwaks, 2012, Gilchrist, 2016), sendo as primeiras candidatas para o tratamento já em 1994 (Trounson *et al.*, 1994). Além disso, a MIV pode representar uma oportunidade para preservação de oócitos de mulheres diagnosticadas com câncer que podem ter a fertilidade comprometida, seja pela doença em si ou pelos tratamentos gonadotóxicos de radioterapia e quimioterapia, especialmente em casos de tumores sensíveis a estrógeno e/ou que precisam iniciar terapia com urgência, não tendo período suficiente para aplicar o protocolo de estimulação ovariana controlada (Coticchio *et al.*, 2012; Lonergan & Fair, 2016). Outra vantagem desta técnica é a redução de custos para as pacientes e a adoção de um protocolo menos desgastante para a paciente, devido à menor necessidade de monitoramento e de medicamentos (Lonergan & Fair, 2016).

A maturação oocitária consiste em um conjunto de eventos intracelulares e intercelulares que resultam na maturação nuclear e citoplasmática do oócito. Resumidamente, no núcleo, que estava em prófase I, ocorre a progressão da meiose até a metáfase II; enquanto no citoplasma acontece a organização e redistribuição de organelas, movimentação dinâmica do citoesqueleto e a produção de moléculas necessárias para a fertilização e um bom desenvolvimento embrionário. (Coticchio *et al.*, 2012; Lonergan & Fair., 2016; Buratini *et al.*, 2021).

Moléculas presentes no líquido folicular e produzidas pelas células do *cumulus* (CCs) determinam de forma parácrina ambos os eventos: a manutenção da parada meiótica e a retomada meiótica. Durante o bloqueio meiótico, níveis elevados de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP), produzidos pelo oócito e suplementados pelas células murais da granulosa e CCs, ativam a proteína kinase A cAMP-dependente (PKA), que inibe o fator promotor de maturação (MPF) (Coticchio *et al.*, 2012). Além disso, as células murais da granulosa produzem moléculas do precursor de peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), que levam ativação do

receptor B do peptídeo natriurético (NPR2), induzindo a produção de monofosfato de guanina cíclica (cGMP). Após transferência para o oócito, o cGMP tem a ação de inibir a fosfodiesterase tipo 3 (PDE3), a qual degrada cAMP no oócito para a retomada meiótica (Gilchrist, 2011). Essa comunicação *cumulus*-oócito é mediada pelas projeções transzonais (TZP), extensões das CCs que penetram a zona pelúcida e alcançam o oócito para transmissão de moléculas essenciais para a homeostase do oócito e controle da maturação, sendo as junções do tipo GAP constituintes das TZPs (revisado por Buratini *et al.*, 2017; Buratini *et al.*, 2021; Buratini *et al.*, 2022).

*In vivo*, um pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) é responsável pela indução da maturação oocitária, estimulando também a expansão das CCs, a ruptura folicular (Richards *et al.*, 2002; Noma *et al.*, 2011) e a luteinização dos folículos pré-ovulatórios (Richards *et al.*, 1998). A ligação do LH com seu receptor (LHR) nas células murais da granulosa promove redução da atividade de NPR2, e consequentemente, da produção de cGMP pelas CCs. (Pan & Li, 2019). Simultaneamente, a ativação da cascata de EGF-likes, especificamente ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC), é desencadeada pela ligação do LH ao seu receptor. Os EGF-likes são expressos e se ligam aos seus receptores (EGFR ou ErbB1) nas células murais da granulosa, ativando a via ERK1/2 nestas células e, de forma parácrina, induz a ativação da cascata p38MAPK e expressão de EGF-likes nas CCs. A ativação dos receptores EGFR nas células do *cumulus* ativa a via ERK1/2, que sinaliza para o oócito a retomada da meiose até a metáfase II e a expansão das CCs (Gilchrist, 2011; Landim- Alvarenga & Maziero, 2014; Richani & Gilchrist, 2017; Shimada *et al.*, 2015; Fan & Sun, 2019). A via ERK1/2 promove a retomada da meiose ao estimular a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosforilando as conexinas presentes nas junções GAP e levando à retração das TZPs. Este processo interfere na passagem de cGMP para o oócito, reduzindo sua concentração intraoocitária (revisado por Buratini *et al.*, 2017; Buratini *et al.*, 2021) o que, consequentemente, suspende a inibição da atividade de PDE3. Isso resulta na degradação de cAMP e na retomada da meiose (revisado por Gilchrist, 2011).

Atualmente, os protocolos de MIV na espécie bovina têm como indutor da maturação oocitária o hormônio folículo estimulante (FSH), o qual promove a expressão e secreção da ampirregulina (AREG) e epirregulina (EREG) diretamente pelas CCs, através da ligação aos seus receptores FSHR (Freimann *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2013), diferente de como ocorre *in vivo*, uma vez que as células do *cumulus* e o oócito expressam pouco ou nenhum receptor para LH (Shimada *et al.*, 2016). A ativação da via AREG/EREG-ERK1/2 nas

CCs por FSH também causa a retração das TZPs, promovendo a retomada meiótica (revisado por Buratini *et al*, 2022). Além desta via, o FSH também induz a mobilização de cálcio intracelular (Sirard *et al*, 2007) e a ativação de PKC, que atua diretamente na fosforilação das conexinas presentes nas junções do tipo GAP entre as CCs e oócito, promovendo o seu fechamento (Shimada *et al*, 2016) e, consequentemente, a retomada meiótica devido ao bloqueio da passagem de sinais inibitórios (cAMP e cGMP) para o oócito (Luciano *et al*, 2011).

No entanto, ao remover os COCs do ambiente folicular para os procedimentos *in vitro*, os oócitos podem ter a meiose espontaneamente retomada, o que promove uma assincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear, comprometendo a aquisição da competência oocitária (Gilchrist *et al.*, 2011, Landim-Alvarenga & Maziero, 2014). Além disso, os meios de maturação utilizados não refletem o ambiente fisiológico do folículo ovariano, o que pode também comprometer a competência para o desenvolvimento. Esses fatores podem justificar o fato das taxas de gravidez e de implantação utilizando a técnica de MIV serem inferiores às taxas de protocolos convencionais, onde a maturação oocitária ocorre *in vivo* (Chen *et al.*, 2012, Lonergan & Fair., 2016) e evidencia a importância do uso de meios especializados que melhorem a sincronia desses eventos durante a maturação oocitária (Coticchio *et al.*, 2012; Buratini *et al.*, 2021).

A associação de agentes fisiológicos durante a MIV pode resultar em melhor competência oocitária e desenvolvimento embrionário, sendo a suplementação com EGF-likes uma proposta já apresentada na literatura (Richani *et al*, 2013), visto que a via EGF-like/EGFR/ERK1/2 nas células do *cumulus* é essencial para a maturação oocitária (Shimada, 2013). Um estudo mostrou que o FSH como único indutor na MIV não induz expressão suficiente de EGF-likes comparado com os níveis *in vivo*, além de não manter a ativação adequada de EGFR. (Richani *et al*, 2013).

Uma estratégia de aprimoramento do meio de maturação que vem sendo investigada é de mimetizar as condições intrafoliculares a partir do uso de substâncias importantes para o bloqueio e progressão meiótica. A neuroregulina 1 (NRG1) é um peptídeo que também faz parte da família de EGF-likes e sua expressão pelas células da granulosa *in vivo* é estimulada pelo pico de LH. Contudo, a NRG1, ao invés de ser um EGF-like indutor de maturação, atua modulando a velocidade de ativação da cascata de EGF-likes induzida pela ativação do EGFR (Noma, 2011; Shimada & Yamashita, 2011). Embora ocorra um ligeiro estímulo da via ERK1/2, a NRG1 ligada ao seu receptor ErbB2 e/ou ErbB3 suprime os níveis de cálcio

intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ), o que reduz a atividade da proteína quinase C (PKC) de forma que o tempo da retomada meiótica é ajustado (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014; Shimada *et al.*, 2016), regulando o tempo da maturação oocitária e ovulação (Richani & Gilchrist, 2017; Shimada *et al.*, 2016).

Em colaboração com o Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão, desenvolvemos anteriormente um sistema de maturação *in vitro* baseado em parâmetros fisiológicos para promover a maturação *in vitro* de oócitos bovinos nomeado “Sistema Folicular” (SF) (Soares *et al.*, 2017). O intuito deste sistema foi expor inicialmente o CCOs a um ambiente semelhante ao encontrado no folículo pré-ovulatório (fase pré-MIV), contendo peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), o qual atua na manutenção da parada meiótica em prófase I (também conhecida por vesícula germinativa, GV) ao aumentar a produção de cGMP nas CCs (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Franciosi *et al.*, 2014), proporcionando ao oócito mais tempo para realizar as alterações citoplasmáticas necessárias. Na segunda fase do SF (fase MIV), utilizou-se agentes fisiológicos, como AREG, IGF-1 em concentrações intrafoliculares, baixa concentração de FSH e hormônios esteroides a fim de induzir a maturação final do CCOs pela ativação da cascata ovulatória nas células do *cumulus* com (fase MIV). Além disso, recentemente nosso laboratório avaliou o efeito da NRG1 na fase MIV desse sistema e os resultados indicaram diminuição da velocidade de retomada da meiose, o que pode ter contribuído na sintonia entre a maturação nuclear e citoplasmática, visto que o tratamento aumentou a produção embrionária pós-FIV (Dellaqua *et al.*, 2023).

Estudos com camundongos revelaram que a NRG1 e AREG atuam em associação na MIV e é importante para a competência oocitária e sucesso na fertilização (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014). Resultados recentes com o modelo bovino foram semelhantes, em que a suplementação com NRG1 no meio de maturação resultou em embriões de melhor qualidade (Dellaqua *et al.*, 2023). Além disso, este estudo mostrou que o uso de NRG1 durante a MIV induzida com AREG modulou a expressão dos genes relacionados a maturação oocitária, uma vez que a NRG1 diminuiu a expressão de *EGFR*, gene fortemente relacionado com a retomada da meiose (Abbassi *et al.*, 2021) e aumentou a expressão de *NPR2*, responsável pela produção de cGMP que, após ser transportado das CCs para o oócito, mantém a parada meiótica (Wang *et al.*, 2013).

Com o intuito de aprimorar o Sistema Folicular, tendo em vista que a ativação gradual da cascata ovulatória e consequente comunicação *cumulus*-oócito prolongada pode ser crítica

para maximizar a competência oocitária (Buratini *et al.*, 2022), no presente estudo, buscamos avaliar o impacto da ativação da cascata ovulatória de forma sequencial sobre a maturação oocitária e produção embrionária, bem como e avaliar os efeitos da suplementação com NRG1 em diferentes momentos da maturação *in vitro*.

Estudos anteriores descrevem grande similaridade entre as espécies humana e bovina, no que se diz respeito à dinâmica folicular ovariana e ao controle endócrino da atividade folicular (Beker van Woudenberg *et al.*, 2012; Malhi *et al.*, 2007). Análises filogenéticas de proteínas envolvidas com desenvolvimento embrionário e fertilização mostraram que oócitos humanos são mais próximos aos de fêmeas bovinas, do que oócitos de camundongos, um modelo experimental frequentemente utilizado na pesquisa (Santos *et al.*, 2014). Além disso, fêmeas bovinas são de uma espécie mono-ovulatória (ou seja, um oócito ovulado por ciclo), assim como as mulheres, enquanto fêmeas de camundongos são poliovulatórias (vários oócitos ovulados por ciclo) (Webb *et al.*, 2007; Orisaka *et al.*, 2021). Essas informações evidenciam que o modelo animal bovino, além do seu papel no avanço das tecnologias de reprodução artificial para a agropecuária, representa uma metodologia excelente para estudos translacionais sobre a maturação oocitária e fertilização *in vitro* em humanos.

## 2. OBJETIVO

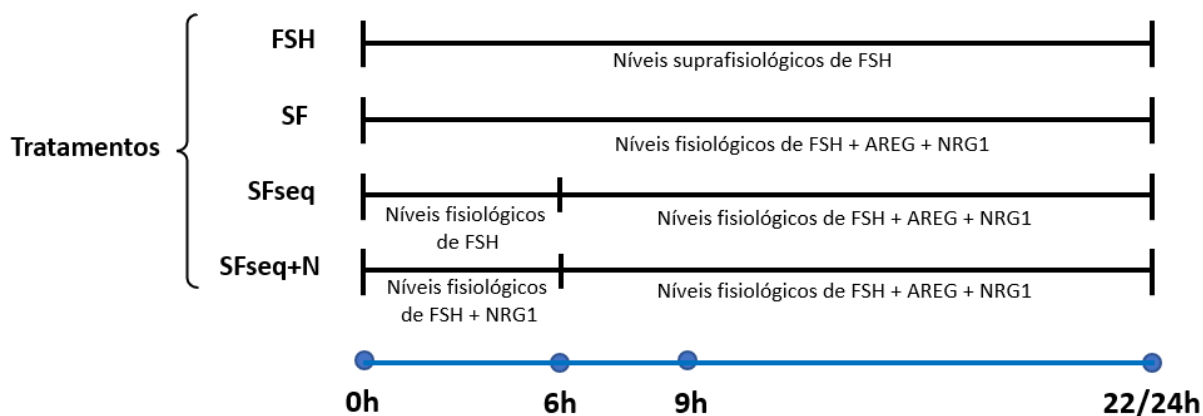
Investigar os efeitos de uma estimulação sequencial com FSH e AREG, bem como da adição de NRG1 durante a MIV de oócitos bovinos sobre a progressão meiótica e a produção embrionária.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Delineamento experimental

Para avaliar os efeitos de uma estimulação sequencial com adição de NRG1 durante a MIV, foram realizados dois experimentos. O primeiro teve como objetivo avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a progressão meiótica, enquanto o segundo, sobre a produção embrionária. Assim, os COCs foram cultivados em 400  $\mu$ L do meio respectivo ao tratamento, sendo o meio de maturação base para todos os grupos composto por TCM 199 contendo BSA (0,4%), piruvato (22  $\mu$ g/mL), amicacina (75  $\mu$ g/mL) e cisteamina (1 mM/mL). Para ambos os experimentos, quatro grupos experimentais foram avaliados, em que FSH e SF constituíram os grupos-controle (sem alteração de meios durante a MIV) e SFseq (MIV sequencial) e

SFseq+NRG1 (MIV sequencial + NRG1), foram aplicados os tratamentos sequenciais, em que houve alterações de meios durante a MIV (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática do sistema de maturação proposto com os principais moduladores e indutores. A MIV foi realizada com os tratamentos FSH (convencional), SF (MIV do Sistema Folicular), SFseq (MIV sequencial) e SFseq (MIV sequencial + NRG1). Ao final de cada tempo de maturação, os COCs foram destinados à avaliação da progressão meiótica (Experimento 1) ou submetidos a FIV e CIV para posterior análise da produção embrionária (Experimento 2).

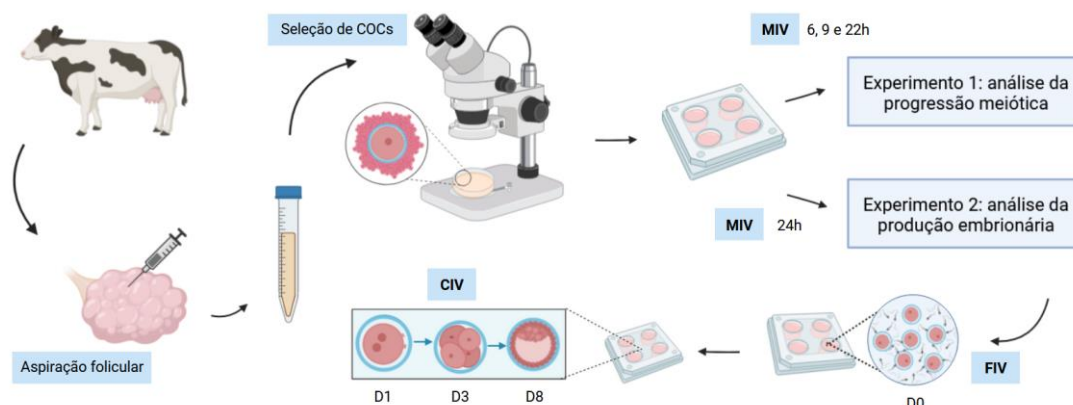
O meio convencional de FSH foi composto pelo meio base acrescido de FSH (0,1 UI/mL) enquanto no meio SF foi adicionado FSH (0,01 UI/mL), AREG (100 ng/mL), NRG1 (1 ng/mL), IGF-1 (10 ng/mL), 17 $\beta$ -estradiol (50 ng/mL) e progesterona (150 ng/mL) ao meio base. Para os tratamentos sequenciais, o primeiro meio foi composto pelo meio base suplementado com FSH (0,01 UI/mL), IGF-1 (10 ng/mL), 17 $\beta$ -estradiol (50 ng/mL) e progesterona (150 ng/mL), acrescido de 1 ng/mL NRG1 (grupo SFseq+NRG1) ou não (grupo SFseq). Por fim, após 6 horas de MIV, os meios dos tratamentos sequenciais foram substituídos pelo meio SF em ambos.

**Experimento 1:** *Avaliação do efeito da ativação sequencial da cascata de maturação e suplementação com NRG1 durante a MIV sobre a progressão meiótica*

Em 4 réplicas experimentais, os 4 tratamentos anteriormente descritos foram testados em grupos de 20 a 25 COCs bovinos, cultivados em 400  $\mu$ L de meio durante 0, 6, 9 e 22 horas. Ao final de cada tempo de cultivo, os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst para análise microscópica da progressão meiótica.

**Experimento 2:** *Avaliação do efeito da ativação sequencial da cascata de maturação e suplementação com NRG1 durante a MIV sobre a produção e qualidade embrionária*

Em 5 réplicas experimentais, grupos de 25 a 30 COCs bovinos foram maturados conforme os tratamentos anteriormente descritos, durante 24 horas. Após a MIV, os COCs maduros foram submetidos a FIV e CIV. No dia 3 e o final de 7 dias de cultivo (D8), a taxa de clivagem e a produção embrionária foram avaliadas, respectivamente. Por fim, os embriões foram corados com Hoechst para realizar a contagem de células embrionárias totais. O desenho experimental de ambos os experimentos está representado na figura 2.



**Figura 2.** Desenho representativo dos processos realizados para os experimentos 1 e 2.

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

Ovários bovinos obtidos de abatedouros locais foram utilizados para obtenção dos COCs imaturos. Os ovários foram conduzidos ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) aquecida à 37°C e utilizados imediatamente. Após higienização dos mesmos com álcool 70%, a aspiração dos folículos com diâmetro de 3 a 8 mm foi realizada com o uso de seringa de 10 mL e agulha 19G.

O fluído folicular coletado foi depositado em tubos cônicos estéreis aquecidos em banho maria à 37°C até a formação de um pellet. Após sedimentação no líquido folicular, os COCs foram recuperados e classificados, utilizando um estereomicroscópio, como: grau I, II ou III, de acordo com suas características celulares (Khurana and Niemann, 2000). Para constituir os grupos experimentais, somente aqueles com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de CCs compactas (grau I e II) foram selecionados e separados para cada grupo.

Os COCs foram lavados em gotas de meio TCM199 com HEPES contendo BSA (4 mg/mL) e amicacina (75 µg/mL), com o objetivo de retirar possíveis resíduos do líquido folicular, para então serem transferidos para as placas de maturação previamente preparadas e identificadas.

### 3.3. Maturação oocitária *in vitro* (MIV)

Placas de 4 poços (NUNC®) foram previamente preparadas com 400 µL do meio de maturação respectivo ao tratamento dos grupos experimentais, conforme anteriormente descrito, e mantidas em incubadora a fim de estabilizar quanto a temperatura e atmosfera até o momento da transferência dos COCs.

Os COCs coletados imediatamente após seleção (0h) foram direcionados para o processo de denudação e fixação, descritos no tópico 3.4. Após transferência dos COCs, as placas MIV retornaram à incubadora, configurada à temperatura de 38,5°C e umidade saturada do ar com 5,5% de CO<sub>2</sub>, as quais foram mantidas durante o período pré-determinado no delineamento experimental.

### 3.4. Análise da progressão meiótica

Após cada período de maturação, os oócitos foram submetidos a sucessivas pipetagens para causar um turbilhonamento a fim de remover as células do *cumulus* circundantes. Em seguida, os oócitos desnudos mecanicamente foram fixados em metanol 60% e corados com Hoechst 33342 para avaliação da progressão meiótica.

Após a confecção das lâminas, as estruturas foram visualizadas em microscópio com epifluorescência para classificação do material genético (figura 3) em vesícula germinativa (GV), quebra de vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), metáfase II (MII) e degenerados (DEG), segundo Lodde *et al*, 2007.



**Figura 3.** Classificação do material genético de oócitos corados com Hoeschst 33342 sob visualização por microscópio com epifluorescência.

### 3.5. Fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV)

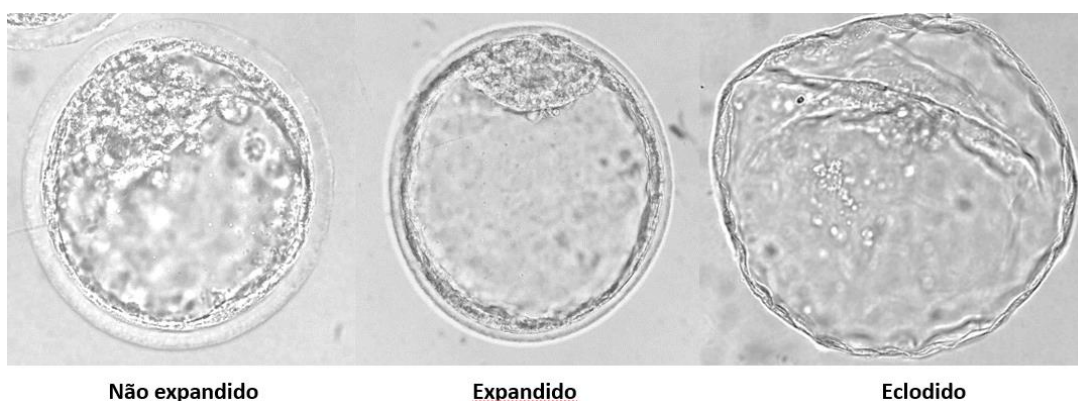
O protocolo de FIV foi realizado com base em Dellaqua e colaboradores (2023). Resumidamente, os espermatozoides criopreservados foram descongelados em banho maria a 37°C por 30 segundos. Em seguida, foram submetidos a centrifugação em 45% - 90% de

gradiente de Select Sperm<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) para seleção dos espermatozoides viáveis e depois em Wash Sperm<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) para retirar possíveis resíduos. Após esta lavagem, os espermatozoides foram contados e adicionados em cada poço com os COCs maturados por 24h, com a concentração final ajustada para  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

COCs e espermatozoides foram incubados em meio FIV (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) durante 18h a 38.5°C em 5,5% de CO<sub>2</sub> em ar umidificado. Após a FIV, os prováveis zigotos foram lavados e as CCs removidas por sucessivas pipetagens ou agitação em vórtex. Inicia-se em seguida o protocolo de CIV, em que os possíveis zigotos transferidos para meio de cultivo embrionário CIV (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) enriquecido com 2,5% de SFB, permaneceram na incubadora com mistura gasosa de 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> a 38.5°C em ar umidificado durante 7 dias completos.

### 3.6. Análise embrionária

Utilizando um microscópio estereoscópico, no dia (D3) do cultivo embrionário as estruturas foram avaliadas quanto a taxa de clivagem e, ao final do período de cultura (D8), a taxa de blastocistos foi avaliada e os blastocistos foram morfológicamente classificados (Figura 4) como não expandidos, expandidos e eclodidos (Jakobsen *et al.*, 2006). Posteriormente, os embriões foram fixados em metanol 60% e os núcleos celulares foram contados sob um microscópio de fluorescência após coloração com Hoechst 33342.



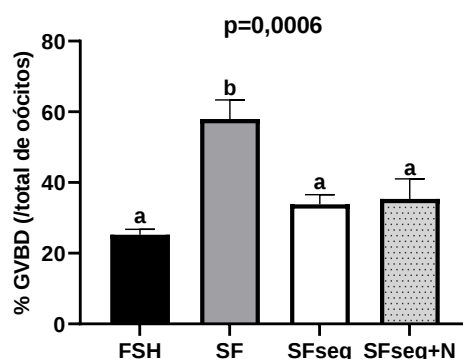
**Figura 4.** Classificação morfológica de blastocistos no D8 de cultivo embrionário sob visualização por microscópio óptico.

### 3.7. Análise estatística

Os efeitos dos tratamentos sobre a maturação oocitária e produção embrionária foram analisados através do software JMP (SAS Institute). Para isto, os dados foram transformados em arco-seno e todos os dados foram testados quando a normalidade com o teste de Shapiro Wilk. Caso a distribuição fosse normal ou não-normal, os efeitos foram testados por ANOVA ou Kruskal Wallis e as médias foram comparadas por Tukey ou Mann-Whitney, respectivamente. Os resultados estão apresentados por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com  $P \leq 0,05$ . Valores de  $P$  na faixa de 0,05 a 0,1 indicam uma tendência biológica.

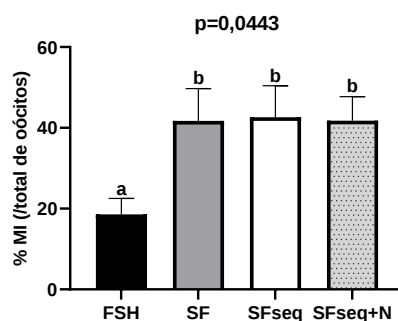
## 4. RESULTADOS

Após 6 horas de MIV, foi possível observar que a ativação sequencial diminuiu a velocidade da quebra da VG em relação ao SF, promovendo uma dinâmica equivalente à obtida com FSH, mas que a adição de NRG1 ao meio não potencializou esse efeito ( $P=0,0006$ ; FSH:  $25,2\% \pm 1,6$ ; SF:  $57,9\% \pm 5,4$ ; SFseq:  $33,9\% \pm 2,7$ ; SFseq+NRG1:  $35,3\% \pm 5,7$ ; Figura 5).



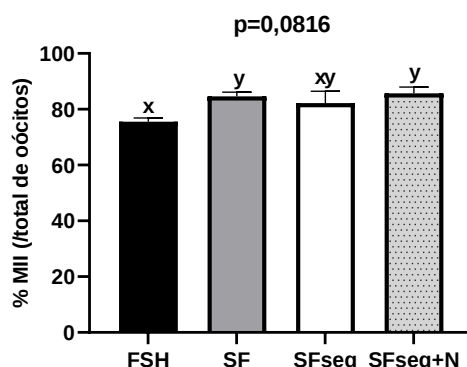
**Figura 5.** Efeitos da ativação sequencial e da suplementação com NRG1 durante a maturação *in vitro* sobre a progressão meiótica às 6 horas de cultivo. As barras representam a porcentagem total de COCs que atingiram a quebra da vesícula germinativa (GVBD) após 6 horas de MIV. Os resultados estão apresentados por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com  $P \leq 0,05$ .

A estratégia sequencial, com ou sem NRG1, não alteraram a dinâmica de maturação às 9 horas da MIV, bem como no tratamento SF, o que proporcionou uma taxa maior de MI em comparação ao FSH ( $P=0,0443$ ; FSH:  $18,6\% \pm 4,0$ ; SF:  $41,7\% \pm 8,0$ ; G:  $42,6\% \pm 7,8$ ; G+NRG1:  $41,8\% \pm 5,9$ ; Figura 6).



**Figura 6.** Efeitos da NRG1 durante a maturação *in vitro* sobre a progressão meiótica às 9 horas de cultivo. As barras representam a porcentagem total de COCs que atingiram a metáfase I (MI) após 9 horas de maturação *in vitro*. Os resultados estão apresentados por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com  $P \leq 0,05$ .

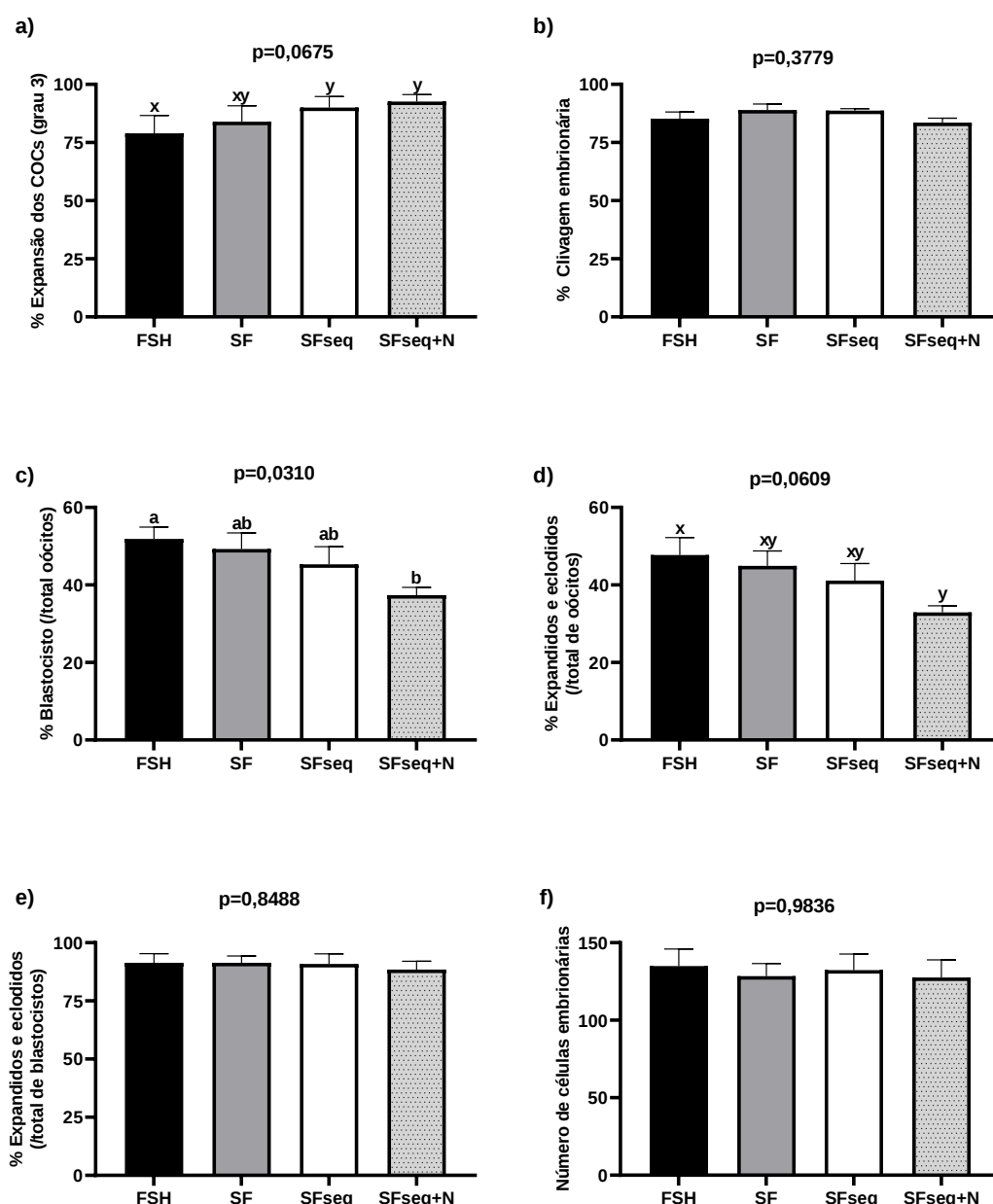
Ao final de 22h de MIV, os grupos SF e SFseq+N tenderam a aumentar as taxas de MII quando comparado ao grupo FSH ( $P=0,0816$ ; FSH:  $75,6\% \pm 1,3$ ; SF:  $84,6\% \pm 1,5$ ; G:  $82,2\% \pm 4,2$ ; G+NRG1:  $85,7\% \pm 2,2$ ; Figura 7).



**Figura 7.** Efeitos da NRG1 durante a maturação *in vitro* sobre a progressão meiótica às 22 horas de cultivo. As barras representam a porcentagem total de COCs que atingiram a metáfase II (MII) após 22 horas de MIV.

Ao avaliarmos a expansão das células do *cumulus*, observamos que os grupos SFseq e SFseq+N tenderam a aumentar a proporção de COCs com expansão completa em relação ao grupo FSH ( $P=0,0675$ ; FSH:  $78,9\% \pm 7,7$ ; SF:  $83,9\% \pm 6,9$ ; SFseq:  $90,0\% \pm 4,7$ ; SFseq+N:  $92,6\% \pm 3,0$ ; Figura 8,a). Quanto à produção embrionária, observamos primeiramente que a clivagem embrionária não diferiu entre os grupos ( $P=0,3779$ ; FSH:  $85,2\% \pm 2,9$ ; SF:  $88,9\% \pm 2,6$ ; SFseq:  $88,7\% \pm 0,88$ ; SFseq+N:  $83,6 \pm 1,9$ ; Figura 8,b). Ao final do cultivo, notamos que a adição de NRG1 nas fases iniciais do tratamento SFseq reduziu a taxa de blastocisto ( $P=0,0310$ ; FSH:  $51,9 \pm 3,0$ ; SF:  $49,3 \pm 4,2$ ; SFseq:  $45,3 \pm 4,5$ ; SFseq+N:  $37,4 \pm 2,0$ ; Figura 8,c) e tendeu a reduzir a produção de embriões viáveis (blastocistos expandidos e eclodidos) comparados ao FSH ( $P=0,0609$ ; FSH:  $47,7 \pm 4,5$ ; SF:  $44,9 \pm 3,8$ ; SFseq:  $41,1 \pm 4,4$ ; SFseq+N:

32,9 ± 1,7; Figura 8,d). No entanto, não houve diferenças na produção de embriões viáveis em relação ao total de blastocistos produzidos (P=0,8488; FSH: 91,4 ± 3,9; SF: 91,4 ± 2,9; SFseq: 90,9 ± 4,3; SFseq+N: 88,5 ± 3,6; Figura 8,e) ou no número total de células embrionárias (P=0,9836; FSH: 134,97 ± 11,0; SF: 128,4 ± 8,1; SFseq: 132,3 ± 10,4; SFseq+N: 127,6 ± 11,3; Figura 8,f).



**Figura 8:** Efeitos dos tratamentos utilizados sobre a expansão máxima dos CCs (a), clivagem embrionária (b), taxa de blastocistos (c), taxa de embriões viáveis em relação ao total de oócitos (d), taxa de embriões viáveis em relação ao total de blastocistos produzidos (e) e número total de células embrionárias (f). Os resultados estão apresentados por média ± erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com  $P \leq 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A maturação oocitária é um processo complexo e vital que envolve a maturação nuclear e citoplasmática do gameta, eventos estes necessários para a aquisição da competência oocitária, que é adquirida progressivamente durante o desenvolvimento folicular. A competência oocitária pode ser definida pela habilidade do oócito de maturar, ser fertilizado e sustentar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Lonergan, 2013), envolvendo alterações como a remodelação do oócito para aceitar e integrar o genoma masculino, reprogramação nuclear para totipotência no zigoto e ativação do genoma embrionário (Conti & Franciosi, 2018; Aguila et al., 2020).

Apesar de ser capaz de atingir a maturidade nuclear, os oócitos imaturos submetidos a MIV podem ter a maturação citoplasmática comprometida, uma vez que a retomada espontânea da meiose pode provocar uma assincronia entre estes eventos (Soares *et al*, 2019), que é um grande fator para a baixa produção de embriões *in vitro* (Landim-Alvarenga and Maziero, 2014; He et al., 2021). Portanto, estudar a maturação oocitária e seus processos é fundamental para o desenvolvimento de metodologias para melhorar a competência oocitária (Gilchrist & Thompson, 2007; Lonergan & Fair, 2016) e o sucesso de produção embrionária *in vitro* (Landim-Alvarenga and Maziero, 2014).

A fase MIV do Sistema Folicular foi inspirada em indutores presentes na cascata de maturação do ambiente folicular, contendo FSH em concentrações mais fisiológicas e AREG, um peptídeo importante para os eventos da maturação oocitária e expansão das células do *cumulus*. Avaliou-se recentemente, a suplementação com NRG1, que, em associação com a AREG, modulou a retomada meiótica (GVBD) (Dellaqua *et al.*, 2023), provavelmente em decorrência do prolongamento da transferência de cGMP através das junções do tipo GAP, o que pode também ter auxiliado na entrega de outros metabólitos das células do *cumulus*, como piruvato e NADPH, ambos já avaliados como cruciais para a homeostase e competência oocitária (revisado por Buratini *et al*, 2022). Buscando promover um ambiente *in vitro* mais semelhante ainda ao ambiente *in vivo*, objetivou-se avaliar o impacto da ativação sequencial da cascata de maturação, simulando a liberação progressiva dos indutores envolvidos neste processo.

Neste presente estudo, observou-se que o tratamento SF acelerou a retomada da meiose em relação ao sistema convencional com FSH, enquanto os grupos de oócitos tratados com SFseq e SFseq+N tiveram a quebra da vesícula germinativa equivalente ao FSH (figura 5).

Pode-se sugerir que nos grupos com ativação sequencial da maturação oocitária, a expressão de *EGF-like*s se deu através da indução por FSH, tendo uma menor ativação da via EGFR/ERK1/2 em relação ao grupo SF, o qual foi suplementado com AREG desde o início da MIV e estimula diretamente a retomada meiótica (Gilchrist, 2011; Landim- Alvarenga & Maziero, 2014; Richani & Gilchrist, 2017).

Com a condensação dos cromossomos para iniciar a retomada meiótica, estes ficam inativos e, a partir de GVBD, há uma parada da maioria, senão de todas, as atividades transcricionais até a transição materna-embrião no início do desenvolvimento embrionário (Fair *et al*, 1997; Tremblay *et al*, 2005; Luciano *et al.*, 2014). Mesmo que a capacidade de tradução e síntese proteica seja mantida durante o desenvolvimento do oócito e embriogênese (Sirard, 2001), prolongar o estágio de GV parece ser uma boa estratégia para promover melhor maturação citoplasmática, visto que há mRNAs importantes para a competência oocitária. (Calder *et al*, 2005; Macaulay *et al.*, 2014). Além disso, a competência oocitária em sustentar o desenvolvimento embrionário inicial tem sido atribuída ao acúmulo de mRNA produzidos antes do silenciamento do genoma oocitário (revisado por Buratini *et al*, 2022).

Após a fase inicial da maturação sequencial (6h), os grupos SFseq e SFseq+N passaram a ser maturados em meio SF, contendo ambos os *EGF-like*s (AREG e NRG1). Apesar de ter uma menor aceleração da retomada meiótica, os tratamentos sequenciais SFseq e SFseq+N não alteraram a progressão meiótica até MI, semelhante ao grupo SF e diferentemente do grupo FSH (figura 6). A NRG1 suporta a ativação de ERK1/2 induzida por EGFR, entretanto, por suprimir os níveis de  $Ca^{2+}$  e, conseqüentemente, diminuir a atividade de PKC (Richani & Gilchrist, 2017; Shimada *et al*, 2016), ocorre a modulação da progressão meiótica, atrasando o processo nas primeiras horas sem alterar os eventos seguintes, como já avaliado anteriormente por nosso grupo de pesquisa onde avaliou a interação da NRG1 com AREG (Dellaqua *et al.*, 2023) e outros (Noma *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2014). Além disso, embora não seja estatisticamente diferente, a MIV sequencial SFseq+N e a MIV contínua SF tenderam a aumentar as taxas de MII ao final de 22h (figura 7). Este achado pode sugerir que, além da associação AREG + NRG1 auxiliar na modulação da meiose (Noma *et al*, 2011; Kawashima *et al*, 2014; Dellaqua *et al.*, 2023), o uso de NRG1 desde o início da maturação pode ser fundamental para a modulação de outros mecanismos que resultem na maturação nuclear oocitária, ressaltando a importância da manutenção da comunicação *cumulus*-oócito neste período (Luciano *et al.*, 2011, Buratini *et al.*, 2023).

A aquisição da competência oocitária depende da sincronia entre os eventos da maturação citoplasmática com os eventos da maturação nuclear (Ferreira *et al*, 2009) e a qualidade oocitária é o principal fator determinante do potencial de desenvolvimento do embrião (Wang and Sun, 2007). Um dos indicadores da qualidade da maturação oocitária é a expansão das células do *cumulus* (Lonergan & Fair, 2016), que pode facilitar a passagem do espermatozoide, favorecendo a fertilização (Ball *et al*, 1983). Esse evento é estimulado com a ativação de ERK1/2 (Fan & Sun, 2019) e está diretamente relacionado ao sucesso do desenvolvimento embrionário (Chen *et al*., 1993; Gutnisky *et al*, 2007). A via ERK1/2 induz a expressão de fatores como PTX3 (pentraxina 3), TNFAIP6 (tumor necrosis fator-inducible gene 6 protein), prostaglandina sintase 2 (PTGS2 ou COX2) e hialurona sintase 2 (HAS2) (Dellaqua *et al*, 2023; Noma *et al*, 2011; Shimada *et al*., 2006; Assidi *et al*., 2010; Prochazka *et al*., 2012), importantes para a formação da matriz extracelular das CCs e a consequente expansão do *cumulus* (Noma *et al*, 2011). A expressão gênica desses fatores (TNFAIP6, PTGS2 and PTX3) é menor em células do *cumulus* derivadas de oócitos maturados *in vitro* comparado com células do *cumulus* isoladas de oócitos maturados *in vitro* (Ouandaogo *et al*, 2012). Assim, o uso de sistemas mais fisiológicos para a maturação *in vitro* parece ser importante para promover melhor expressão desses genes e expansão do *cumulus*. Entretanto, neste estudo observamos apenas uma tendência biológica, onde os tratamentos SFseq e SFseq+N tenderam a aumentar a taxa de COCs expandidos em relação ao FSH.

Ao avaliarmos a clivagem embrionária, analisada no D3 da CIV, não observamos diferenças entre os tratamentos, levando a reflexão que os tratamentos apresentam desempenhos semelhantes quanto à capacidade de promover o desenvolvimento embrionário inicial. Apesar disso, a NRG1 já se mostrou atuar na atividade mitocondrial dos oócitos, auxiliando no desenvolvimento durante esse estágio (Mao *et al*., 2012). Quanto a taxa de blastocistos, os grupos com tratamentos fundamentados no Sistema Folicular (SF, SFseq e SFseq+N) apresentaram menores taxas em relação ao FSH. Como observado na figura 6, estes grupos atingiram rapidamente o estágio de MI e, consequentemente, o estágio de MII. Assim, acreditamos que, ao realizar uma MIV de 24 horas com os tratamentos de indução mais fisiológica da cascata de maturação, ocorreu o prolongamento da parada meiótica em MII.

O prolongamento da MIV pode melhorar a taxa de maturação nuclear, uma vez que os oócitos terão mais tempo para atingirem a metáfase II, entretanto, o excesso de tempo neste período pode afetar a aquisição de competência oocitária adequada e posteriormente, a qualidade embrionária e a taxa de blastocistos (Heinzmann *et al*, 2015; Yang *et al*, 2021). Um

estudo revelou que o prolongamento de parada meiótica em MII leva a perda gradual da capacidade de suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Dominko and First, 1997). A perda da competência oocitária tem sido atribuída ao processo de envelhecimento decorrente da prolongação do cultivo oocitário (Koyama *et al*, 2014). O envelhecimento oocitário contempla uma série de alterações morfológicas e celulares, afetando a membrana plasmática, zona pelúcida, atividade das mitocôndrias, estrutura do citoesqueleto e suas movimentações importantes para a fertilização, entre outros, e que se inicia caso a fertilização não ocorra no período ideal (Miao *et al*, 2009). Já foi reportado que oócitos envelhecidos *in vivo* e *in vitro* frequentemente apresentam menores taxas de fertilização e formação de blastocistos (Takahashi *et al*, 2013).

Assim, observamos que essa janela de tempo entre o alcance do estágio de MII e o início do envelhecimento oocitário parece se iniciar mais cedo nos grupos SF, SFseq e SFseq+N, uma vez que mais de 80% dos oócitos já se encontravam em MII às 22h de MIV (figura 7) com esses tratamentos mais fisiológicos, além de apresentarem numericamente maior taxa de expansão do *cumulus* às 24h de MIV (figura 8, a). Tais informações podem sugerir que esta janela da maturação *in vitro* deve ser ajustada de modo que a parada meiótica em MII não seja prolongada ao ponto de prejudicar a qualidade do oócito (Koyama *et al*, 2014). Além disso, este mesmo estudo relatou que, em bovinos, a fertilização é otimizada com uma maturação de 20 a 22h (Koyama *et al*, 2014). Outra estratégia que vem sendo discutida é o controle do envelhecimento oocitário, que pode permitir tempo suficiente para manipulação e seleção de oócitos de melhor qualidade, sendo óxido nítrico (NO), ditiotreitol (DTT) e cafeína alguns dos agentes que reduzem o envelhecimento oocitário (Miao *et al*, 2009).

Apesar do número reduzido de embriões, a qualidade desses não foi afetada, como demonstrado pelos resultados de taxa de embriões viáveis (blastocistos expandidos e eclodidos) em relação ao total de blastocistos produzidos (figura 8,e), assim como no número total de células embrionárias (figura 8,f), em que todos os tratamentos tiveram resultados semelhantes. O número total de células embrionárias inclui as células da massa celular interna e do trofotoderma, e já é bem estabelecido o papel determinante da quantidade destas células na habilidade do embrião em progredir no desenvolvimento (Kong *et al*, 2016) e para a qualidade embrionária final (Sugimura *et al*, 2012). Blastocistos de qualidade superior possuem mais células do que blastocistos de qualidade inferior (Farin *et al*, 1997), além de se desenvolverem mais rápido que aqueles classificados como morfológicamente inferiores (Jakobsen *et al*, 2006), demonstrando a relevância desse parâmetro para a análise dos embriões resultantes. Na

reprodução humana, por exemplo, a análise da quantidade celular auxilia na seleção de embriões, o que contribui em maiores taxas de implantação e nascimento (Kong *et al.*, 2016). Por outro lado, estudos anteriores em bovinos mostraram que a adição de NRG1 ao meio induzido com AREG (SF) aumentou a quantidade de células totais dos blastocistos produzidos, tal qual impulsionou a taxa de embriões expandidos e eclodidos, impactando assim positivamente o desenvolvimento e qualidade dos embriões cultivados (Dellaqua *et al.*, 2023).

Assim, esses achados incentivam a continuidade de nossas pesquisas sobre a maturação *in vitro*, visando aprimorar o desempenho dessa técnica com potenciais aplicações na medicina humana e impactos na agropecuária. O meio de maturação e o tempo deste processo são variáveis críticas que influenciam diretamente a competência oocitária e produção embrionária. Inspirado nos resultados promissores do Sistema Folicular e na fisiologia ovariana, o presente estudo propôs a ativação sequencial da cascata de maturação. Os efeitos do tratamento sequencial (SFseq e SFseq+N) em relação ao tratamento estático (SF) foram promissores no que se refere a maturação oocitária inicial, entretanto, o estudo revelou que o modelo proposto não atendeu às expectativas em relação a produção embrionária. Portanto, ajustes no tempo de exposição aos moduladores e/ou indutores de maturação são fundamentais para aprimorar o desenvolvimento embrionário, indicando um caminho para as futuras investigações.

## 6. CONCLUSÃO

A indução sequencial da cascata de maturação com FSH e AREG e suplementação com NRG1 alterou a dinâmica da maturação nuclear, entretanto, o modelo proposto não foi suficiente para melhorar a produção embrionária. Estratégias para ajustar o tempo das etapas de maturação e/ou reduzir o envelhecimento oocitário são sugeridas para melhor competência oocitária e aumento da produção embrionária.

## REFERÊNCIAS

- ABASSI, L., EL-HAYEK, S., CARVALHO, K.F., 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. **Nature Communications**, v. 12, p. 01-13, 2021.
- AGUILA, L.; TREULEN, F.; THERRIEN, J.; FELMER, R.; VALDIVIA, M.; SMITH, L. C. Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. **Animals**, v. 10(12), p. 2196, 2020.
- ASSIDI, M., DIELEMAN, S. J., & SIRARD, M.-A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140(6), p. 835-852, 2010.
- BALL, G. D., LEIBFRIED, M. L., LENZ, R. W., AX, R. L., BAVISTER, B. D., FIRST, N. L. Factors Affecting Successful in Vitro Fertilization of Bovine Follicular Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 28(3), p. 717-725, 1983.
- BEKER VAN WOUDEBERG, A.; GROLLERS-MULDERIJ, M.; SNEL, C.; JEURISSEN, N.; STIERUM, R.; WOLTERBEEK, A. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 251-260, 2012.
- BILODEAU-GOEESELS S. Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animals**. v. 47(4), p. 687-93, 2012.
- BURATINI J., DELLAQUA T.T., DE LIMA P.F., RENZINI M.M., CANTO M.D., PRICE C.A. Oocyte secreted factors control genes regulating FSH signaling and the maturation cascade in cumulus cells: the oocyte is not in a hurry. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 40(8), p. 1961-1971, 2023.
- BURATINI J., DELLAQUA T.T., DAL CANTO M., LA MARCA A., CARONE D., MIGNINI RENZINI M., WEBB, R. 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, 2022.
- 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.
- CALDER, M., CAENEY, A., SIRARD, M., & WATSON, A. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 83(4), p. 1077-1085, 2005.
- CAIXETA, E.S.; MACHADO, M.F.; RIPAMONTE, P.; PRICE, C.; BURATINI, J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 890-899, 2013.
- CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 7709-7712, 1990.
- CHA, K. Y., KOO, J. J., KO, J. J., CHOI, D. H., HAN, S. Y., YOON, T. K. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. **Fertility and Sterility**, v. 55(1), p. 109-113, 1991.
- CHEN, L., RUSSELL, P. T., & LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34(1), p. 87-93, 1993.
- CHEN, C-D, CHEN, S-U, YANG, Y-S. Prevention and Management of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 26, no. 6, p. 817-827, 2012.
- CONTI, M., FRANCIOSI, F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. **Human Reproduction Update**, v. 24(3), p. 245-266, 2018.

- CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 715-723, 2006.
- CORLETA, H. E. In vitro fertilization: more than 4 million children born and a nobel prize. **Revista Clinical & Biomedical Research**. Porto Alegre, v. 30, n. 4, p. 451-455, 2010.
- COTICCHIO, G., DAL-CANTO, M., GUGLIELMO, M.C., MIGNINI-REZZINI, M., FADINI, R. Human oocyte maturation in vitro. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, p. 909-918, 2012.
- DELLAQUA, T.T.; VÍGARO, R.A.; BURATINI, J. Neuregulin 1 (NRG1) modulates oocyte nuclear maturation during IVM and improves post-IVF embryo development. **Theriogenology**, v. 195, p. 209-216, 2023.
- DOMINKO, T., FIRST, N. L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47(4), p. 456-467, 1997,
- FAIR, T., HULSHOF, S. C., HYTTTEL, P., GREVE, T., & BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology (Berlin)**, v. 195, p. 327-336, 1997.
- FALLS, D.L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. **Experimental Cell Research**, v. 284, p. 14-30, 2003.
- FAN, H.-Y., SUN, Q.-Y. Oocyte Meiotic Maturation. **The Ovary**, p. 181-203, 2019.
- FARIN, C.E., HASLER, J.F., MARTUS, N.S., STOKES, J.E. A comparison of Menezes' B2 and tissue culture Medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 48, p. 699-709, 1997.
- FERREIRA E.M., VIREQUE A.A., ADONA P.R., MEIRELLES F.V., FERRIANI R.A., NAVARRO P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.
- FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, SC.; FADINI, R.; DAL CANTO, M.; RENZINI, MM.; ALBERTINI, DF.; LUCIANO, AM. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 61, 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.
- 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.
- GILCHRIST R.B., THOMPSON J.G.. Oocyte maturation: emerging concepts and Technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 6-15, 2007.
- GILCHRIST, R. B., MICHELE, L. THOMPSON, J.G. Oocyte-Secreted Factors: Regulators of Cumulus Cell Function and Oocyte Quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, no. 2, pp. 159-177, 2008.
- GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 23-31, 2011.
- GUTNISKY, C., DALVIT, G. C., PINTOS, L. N., THOMPSON, J. G., BECONI, M. T., CETICA, P. D. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19(3), p. 488-497, 2007.
- HARRIS, R.C.; CHUNG, E.; COFFEY, R.J. EGF receptor ligands. The EGF Receptor Family. **Experimental Cell Research**, v. 284, no. 1, p. 02-13, 2003.
- HEINZMANN, J., MATTERN, F., ALDAG, P., BERNAL-ULLOA, S.M., SCHNEIDER, T., HAAF, T., NIEMANN, H. Extended in vitro maturation affects gene expression and DNA methylation in bovine oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, p. 770-782, 2015.
- HUANG, J. Y. J., ROSENWAKS, Z. Assisted Reproductive Techniques. **Methods in Molecular Biology**, p. 171-231, 2014.

- HUANG, J. Y. J., ROSENWAKS, Z. In vitro fertilisation treatment and factors affecting success. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 26(6), p. 777-788, 2012.
- HUANG F.J., CHANG S.Y., TSAI M.Y., LIN Y.C., KUNG F.T., WU J.F., LU Y.J. Relationship of the human cumulus-free oocyte maturational profile with in vitro outcome parameters after intracytoplasmic sperm injection. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 16, p. 483-487, 1999.
- IUSSIG, B., MAGGIULLI, R., FABOZZI, G., BERTELLE, S., VAIARELLI, A., CIMADOMO, D., UBALDI, F. M., RIENZI, L. (2019). A brief history of oocyte cryopreservation: arguments and facts. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 98, p. 550-558, 2019.
- KAWASHIMA I., UMEHARA T., NOMA N., KAWAI T., SHITANAKA M., RICHARDS J.S., SHIMADA, M. Targeted disruption of Nrg1 in granulosa cells alters the temporal progression of oocyte maturation. **Molecular Endocrinology**, v. 28, p. 706-721, 2014.
- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, p. 741-766, 2000.
- KONG, X., YANG, S., GONG, F., LU, C., ZHANG, S., LU, G., LIN, G. The Relationship between Cell Number, Division Behavior and Developmental Potential of Cleavage Stage Human Embryos: A Time-Lapse Study. **PLoS One**, v. 11, e0153697, 2016.
- KOYAMA, K., KANG, S.-S., HUANG, W., YANAGAWA, Y., TAKAHASHI, Y., & NAGANO, M. Estimation of the Optimal Timing of Fertilization for Embryo Development of In Vitro-Matured Bovine Oocytes Based on the Times of Nuclear Maturation and Sperm Penetration. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76(5), p. 653-659, 2014.
- JAKOBSEN, A.S.; THOMSEN, P.D.; AVERY, B. Few polyploid blastomeres in morphologically superior bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 65, p. 870-881, 2006.
- LAMPE, P. D., TENBROEK E.M., BURT J.M., KURATA W.E., JOHNSON R.G., LAU A.F. Phosphorylation of Connexin43 on Serine368 by Protein Kinase c Regulates Gap Junctional Communication. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, no. 7, p. 1503-1512, 2000.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MAZIERO, R.R.D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v. 11, p. 150-158, 2014.
- LODDE, V., MODINA, S., GALBUSERA, C., FRANCIOSI, F., & LUCIANO, A. M. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: Interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74(6), p. 740-749, 2007.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016.
- LUCIANO A.M., FRANCIOSI F., DIECI C., LODDE V. Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: a journey in company with follicular cells. **Animal Reproduction Science**, v. 149, p. 3-10, 2014.
- LUCIANO A.M., FRANCIOSI F., MODINA S.C., LODDE V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 1252-1259, 2011.
- MACAULAY A.D., GILBERT I., CABALLERO J., BARRETO R., FOURNIER E., TOSSOU P., SIRARD M.A., CLARKE H.J., KHANDJIAN É.W., RICHARD F.J., HYTTEL P., ROBERT C. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v.91(4), p. 90, 2014.
- MALHL, P.S.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J.; SINGH, J. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. **Reproduction**, v. 134, p. 233-239, 2007.
- MAMAN, E., YUNG, Y., KEDEM, A., YERUSHALMI, G.M., KONOPNICKI, S., COHEN, B., DOR, J., HOURVITZ, A. High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 97, p. 592-598, 2012.

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 (4), p. 887-897, 2012.

MIAO, Y.-L., KIKUCHI, K., SUN, Q.-Y., SCHATTEN, H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. **Human Reproduction Update**, v. 15(5), p. 573-585, 2009.

NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR WOMEN'S AND CHILDREN'S HEALTH (UK). Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems. **National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance**. London: Royal College of Obstetricians & Gynaecologists, 2013

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.

ORISAKA, M., MIYAZAKI, Y., SHIRAFUJI, A., TAMAMURA, C., TSUYOSHI, H., TSANG, B. K., & YOSHIDA, Y. The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 20(2), p. 169-175, 2021.

OUANDAOGO, Z. G., FRYDMAN, N., HESTERS, L., ASSOU, S., HAOUZI, D., DECHAUD, H., FRYDMAN, R., HAMAMAH, S. Differences in transcriptomic profiles of human cumulus cells isolated from oocytes at GV, MI and MII stages after in vivo and in vitro oocyte maturation. **Human Reproduction**, v. 27(8), p. 2438-2447, 2012.

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.

PERRY G. 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transf. Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2014.

PROCHAZKA, R., BLAHA, M., NEMCOVA, L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. **Reproduction**, v. 144(5), p. 535-546, 2012.

REDLARA. 32º relatório do Registro Latino-Americano de Reprodução Assistida (RLA),

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.

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.

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.

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

SAUERBRUN-CUTLER M.T., VEJA M., KELTZ M., MCGOVERN P.G. In vitromaturation and its role in clinical assisted reproductive technology. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 70, p. 45-57, 2015.

SISBRIO. 13º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2022.

SHIMADA M. Regulation of oocyte meiotic maturation by somatic cells. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 11(4), p. 177-184, 2012.

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

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

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

SIRARD M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation whit developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

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

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

TAKAHASHI, T., IGARASHI, H., AMITA, M., HARA, S., MATSUO, K., KURACHI, H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 39(10), p. 1431-1439, 2013.

TREMBLAY, K., VIGNEAULT, C., MCGRAW, S., & SIRARD, M. A. Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 1037-1044, 2005.

TROUNSON, A., WOOD, C., KAUSCHE, A. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 353-362, 1994.

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm Animals. International Embryo Technology Society (IETS). **Embryo Technology Newsletter**, v. 40(4), p. 22-40, 2022.

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

WANG, Y., KONG, N., LI, N., HAO, X., WEI, K., XIANG, X., XIA, G., ZHANG, M. Epidermal growth factor receptor signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and meiotic resumption in mouse oocytes. **Endocrinology**, v. 154, p. 3401-3409, 2013.

WANG Q, SUN Q.-Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19(1), p. 1-12, 2007.

WEBB, R., GARNSWORTHY, P. C., CAMPBELL, B. K., & HUNTER, M. G. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v. 68, p. S22-S29, 2007.

YANG, H., MA, Z., PENG, L., KUHN, C., RAHMEH, M., MAHNER, S., JESCHKE, U., VON SCHÖNFELDT, V. Comparison of Histone H3K4me3 between IVF and ICSI Technologies and between Boy and Girl Offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 8574, 2021.

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**, v. 152, p. 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**, v. 330, p. 366-369, 2010.

ZEGERS-HOCHSCHILD F., CROSBY J.A., MUSRI C., PETERMANN-ROCHA F., BORGES DE SOUZA M.D.C., MARTINEZ A.G., AZAMBUJA R., ROQUE A., ESTOFAN G., CROKER M.V.; LATIN AMERICAN NETWORK OF ASSISTED REPRODUCTION. ART in Latin America: the Latin American Registry, 2020. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 47(2), 103195, 2023.

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