

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

**IMPACTO DA ESTIMULAÇÃO SEQUENCIAL DURANTE A MATURAÇÃO
IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS**

Mariana Degli Esposti

Botucatu

2023

MARIANA DEGLI ESPOSTI

**IMPACTO DA ESTIMULAÇÃO SEQUENCIAL DURANTE A MATURAÇÃO
IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS**

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

Orientador

Prof. Dr. José Buratini Júnior

Co-orientadora

MSc. Thaisy Tino Dellaqua

Botucatu

2023

Ficha catalográfica

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

Esposti, Mariana Degli.

Impacto da estimulação sequencial durante a maturação
in vitro de oócitos bovinos / Mariana Degli Esposti. -
Botucatu, 2023

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

Orientador: José Buratini Júnior

Coorientador: Thaisy Dellaqua Tino

Capes: 50504002

1. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 2. Bovino
- Reprodução. 3. Meiose. 4. Neuregulina-1.

Palavras-chave: AREG; Maturação oocitária; NRG1;
Progressão meiótica.

Dedico esta monografia a meu querido avô João Alcides Degli Esposti, que foi uma pessoa de extrema importância na criação da minha personalidade, e que está eternamente em minha memória.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela vida saudável e pela a base familiar que me concedeu, pois sem o amor incondicional e apoio deles nada seria possível. Aos meu país Roberta e Marcilio que mesmo na dificuldade da distância se fizeram presentes. A minha irmã Yasmin e cunhado Gabriel pelo melhor presente que poderiam me dar, minha afilhada Manuela, que conseguiu aumentar ainda mais o meu laço familiar e amor. As minhas avós Maria Amabili e Cecília e avô Onório pelo entusiasmo e torcida frequentemente. A Giovanna por acreditar e impulsionar cada vez mais meus conhecimentos.

Agradeço a UNESP de Botucatu por me proporcionar a vivência e amadurecimento adquirido, pelas amizades construídas que com certeza sem elas o caminho seria árduo e sem graça, principalmente a Nathalia, Inara, Pâmela e Leandro pois foi na presença deles que tive forças para me estabelecer e continuar.

Agradeço ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional de Botucatu, ao meu orientador Prof. Dr. José Buratini por me receberem e pelos conhecimentos adquiridos e crescimento profissional e pessoal. E por fim a minha co-orientadora doutoranda Thaisy Tino Dellaqua por ter paciência e os melhor métodos de ensino, por me incentivar a me aprofundar cada vez mais, tudo que sei referente a laboratório devo a ela.

RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos apresenta descompasso entre os processos fisiológicos e há grande interesse no desenvolvimento de abordagens para melhorar sua eficiência. Diante disso, o objetivo deste projeto foi de avaliar o impacto da estimulação sequencial da cascata ovulatória durante a MIV de oócitos bovinos e avaliar o efeito deste sistema sequencial associado a suplementação com NRG1 na etapa final do procedimento, a fim de aproximar o sistema de cultivo ao ambiente *in vivo* durante o cultivo. Assim, a MIV foi realizada com os seguintes tratamentos: FSH, SF (Sistema Folicular) e SF-s/A (Sistema Folicular sem adição de ampirregulina) durante 6 horas de cultivo e, em seguida, FSH, SF, S (MIV sequencial) e S+NRG1 (MIV sequencial + NRG1) durante 12 e 22 horas de cultivo. Ao final de cada tempo de MIV, os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst para análise da progressão meiótica. Os dados foram transformados em arco-seno, testados por ANOVA e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Em 6 horas de MIV, não houve diferenças entre os grupos SF-s/A e FSH, ambos apresentaram oócitos no estágio de vesícula germinativa, entretanto, o uso de AREG no SF promoveu um adiantamento da meiose, uma vez que houve aumento da quebra da vesícula germinativa. Motivo este que nos motivou a realizar um tratamento sequencial no meio SF durante a MIV. Assim, os grupos SF e S apresentaram maior número de oócitos em metáfase I às 12h, diferindo de FSH, enquanto S+NRG1 não apresentou diferenças dos demais grupos. Além disso, os oócitos atingiram a metáfase II às 22 horas e não houve diferença entre os tratamentos. Conclui-se que o presente estudo fornece evidências que a MIV de oócitos bovinos pode ser realizada de maneira sequencial, com o intuito de sincronizar a maturação nuclear com a citoplasmática para melhorar a eficiência dos protocolos de MIV.

Palavras-chave: maturação oocitária, progressão meiótica, AREG, NRG1.

ABSTRACT

In vitro maturation (MIV) of bovine oocytes shows a mismatch in physiological processes and there is a big interest in the developing approaches to improve its efficiency. Therefore, this project's objective was to evaluate the impact of ovulatory cascade sequential stimulation during MIV of bovine oocytes and to evaluate this sequential system effects associated to NRG1 supplementation in the procedure final step, in order to promote culture conditions more similar to the in vivo environment during the cell culture. This way, the MIV was performed with the following treatments: FSH, SF (follicular system) and SF- s/A (follicular system without addition of amphiregulin) during 6 hours of culture and, following, FSH, SF, S (sequential MIV) and S+NRG1 (sequential MIV + NRG1) for 12 and 22 hours of cell culture. At the end of each MIV time, the oocytes were denuded and stained with Hoechst to analyze the meiotic progression. The data were transformed into arcsine, tested by ANOVA and the differences were considered significant when $P \leq 0,05$. At 6 hours of MIV, there were no differences between the groups SF-s and FSH, both showing oocytes in stage of germinal vesicle, however, when adding AREG in SF na advance in meiosis occurred, once there was na increasement in germinal vesicle breakdown. This reason motivated us to perform a sequential treatment in SF medium during the MIV. Thus, SF and S groups showed an increased number in oocytes in metaphase I at 12 hours, differing from FSH, while S+NRG1 did not showed differences to the other groups. Furthermore, oocytes reached metaphase II at 22 hours and did not showed differences between treatments. It is concluded that the present study provides evidence that bovine oocytes MIV can be performed in sequential manner, with the aim of synchronizing nuclear maturation with cytoplasmatic to improve the efficiency of MIV protocols.

Keywords: oocyte maturation; meiotic progression, AREG, NRG1.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. HIPÓTESE	12
3. OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVO GERAL	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Delineamento experimental	12
4.2 Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes indutores de maturação oocitária sobre a progressão meiótica.....	13
4.3 Experimento 2: Impacto da estimulação sequencial associada à NRG1 durante a MIV sobre a progressão meiótica	13
4.4 Obtenção dos complexos <i>cumulus</i>-oócitos (COCs) <i>post mortem</i>	13
4.5 Maturação oocitária <i>in vitro</i> (MIV)	14
4.6 Análise da progressão meiótica	14
4.7 Análise Estatística.....	15
5 RESULTADOS.....	15
6 DISCUSSÃO.....	17
7 CONCLUSÃO	20
8 REFERÊNCIAS	20

1 Introdução

As pesquisas realizadas no modelo animal bovino são importantes de inúmeras maneiras e proporcionam avanços para o uso das tecnologias de reprodução assistida na agropecuária. Além disso, a reprodução de bovinos se aproxima fisiologicamente da reprodução em humanos, uma vez que estudos translacionais apontaram semelhanças de dinâmica folicular ovariana e controle endócrino entre as duas espécies (Beker van Woudenberg et al., 2012). Como já estudado em humanos e bovinos, os estágios de desenvolvimento folicular, mecanismos reguladores de emergência da onda folicular e a seleção do folículo dominante são equivalentes, assim como a ovulação (Malhi et al., 2007).

Atualmente, é notório o aprofundamento em pesquisas com foco na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, não só pela semelhança com as mulheres, mas também por ser um avanço para a agropecuária, já que o número de gestações provenientes de embriões produzidos *in vitro* é menor em relação àqueles produzidos *in vivo* (SIRARD et al., 2006). Isto pode ser explicado pela eficiência da produção *in vitro* (PIV) de embriões ainda ser consideravelmente baixa, uma vez que apenas 30 a 40% de blastocistos são obtidos dos oócitos submetidos à MIV (SIRARD et al., 2006). A maturação oocitária é uma dentre várias etapas da PIV que são importantes para o desenvolvimento embrionário, em que as alterações fisiológicas durante esse processo servem como ponto de partida para a aquisição de competência oocitária (Kawashima et al., 2014).

In vivo, a maturação oocitária tem como principal marco a retomada meiótica, onde o núcleo que estava mantido desde a vida fetal em prófase I sofre alterações até chegar à metáfase II por meio de efeitos das sinalizações pré-ovulatórias do hormônio luteinizante (LH) (Lonergan and Fair, 2016), e junto a isso, ocorre ativação de determinadas vias metabólicas, rearranjo de diversas organelas citoplasmáticas com intuito de proporcionar a estrutura adequada para a fecundação, que por fim, a meiose será finalizada. (Lonergan and Fair, 2016).

O aumento de LH estimula a cascata ovulatória (Richards et al., 1998), promovendo a maturação oocitária, expansão das células do *cumulus* (CCs) e ruptura folicular (Richards et al., 2002; Noma et al., 2011). Dentre os eventos da cascata ovulatória, o aumento da expressão de fatores de crescimento epidermais (EGFs) promove a ativação de vias de sinalização subsequentes e diferentes respostas, incluindo a regulação da

expressão gênica, proliferação celular e ativação das vias MAPK/ERKs e PI3K/AKT (Harris *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 2006; Prochazka *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013), importantes para a retomada da meiose e a expansão das CCs (Freimann *et al.*, 2004).

Os EGFs fazem parte de um conjugado de EGF e EGF-likes, constituídos por subtipos como ampirregulina (AREG) e neurorregulina 1 (NRG1) que atuam nas comunicações intercelulares entre CCs e oócito ativando a maturação oocitária (Noma *et al.*, 2011; revisado por Richani and Gilchrist, 2017). A NRG1 modula a retomada da meiose por meio da regulação das cascatas intracelulares ativadas pelos demais EGF-likes, principalmente a AREG (Falls, 2003; Noma, *et al.*, 2011; Shimada and Yamashita, 2011), o que preserva a comunicação *cumulus*-oócito por mais tempo e retarda a retomada meiótica, evento este importante para proporcionar tempo para o rearranjo das organelas do oócito e resultar na maturação adequada para a fecundação (Lampe *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2016).

Já no procedimento *in vitro*, o complexo *cumulus*-oócito (COC) é removido de seu ambiente folicular provocando a retomada espontânea da meiose, pois a ausência de sinalizações inibidoras de meiose presentes no fluído folicular faz com que haja a progressão meiótica (Gilchrist, 2011). Sendo assim, os sistemas de cultivo comerciais não reproduzem o ambiente *in vivo*, determinando, assim, um descompasso entre a maturação nuclear e citoplasmática, o que pode resultar no comprometimento da qualidade oocitária (Gilchrist, 2011). A maioria dos laboratórios de reprodução animal utilizam altas dosagens de hormônio folículo estimulante (FSH) para induzir a maturação oocitária, devido a presença de seus receptores (FSHR) nas CCs que promovem a ativação da cascata ovulatória (Freimann *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2013). A ligação deste hormônio com seus receptores eleva os níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) nas CCs, molécula importante de sinalização celular que ativa posteriormente dois tipos existentes de PKA. A do tipo I permitirá que o oócito continue com a presença de vesícula germinativa (GV) e a do tipo II induz o rompimento da mesma (Farin *et al.*, 2007).

Concentrações suprafisiológicas de FSH podem antecipar o fechamento das junções comunicantes entre *cumulus* e oócito (junções GAP), o que provoca a precipitação da progressão meiótica, enquanto que concentrações mais baixas permitem a manutenção da comunicação intercelular entre o oócito e as CCs (Ali and Sirard, 2002).

O fechamento das junções GAP pode ser justificado pela atividade da via PKC, que atua na fosforilação de conexinas presentes em tal junção, causando seu fechamento e interrompendo a passagem de mensageiros entre as CCs e oócito (Shimada et al., 2016). Assim, o uso de altas dosagens de FSH em meios de MIV por longos períodos (20 a 24 horas) podem comprometer a maturação oocitária adequada, uma vez que tal excesso de estimulação difere dos processos fisiológicos. Estudos anteriores demonstram que a substituição de altas concentrações de FSH no meio MIV por AREG, indutor fisiológico da maturação do COC, determina produção embrionária semelhante à proporcionada pelo FSH (Soares et al., 2017), entretanto, o uso de AREG favorece o metabolismo do COC, o que melhora a qualidade embrionária (Sugimura et al., 2014). Diante disso, é importante reforçar o uso de meios de maturação que se aproximem cada vez mais do sistema fisiológico para obter melhores resultados de produção e qualidade do embrião.

Com base nisso, nosso laboratório em colaboração com o Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade de Milão desenvolveu uma estratégia baseada em parâmetros fisiológicos para promover a maturação *in vitro* de oócitos bovinos nomeado “Sistema Folicular” (SF). O intuito deste sistema é expor inicialmente o COCs a um ambiente semelhante ao encontrado no folículo pré-ovulatório (fase pré-MIV) e posteriormente induzir a maturação final do COCs pela ativação da cascata ovulatória nas CCs com agentes fisiológicos que combina em sua composição AREG, concentrações intrafoliculares de IGF-1, FSH e esteroides (fase MIV). Além disso, recentemente nosso laboratório avaliou o efeito da NRG1 na fase MIV desse sistema e os resultados indicaram atraso na retomada da meiose, o que pode ter contribuído na sintonia entre a maturação nuclear e citoplasmática, visto que os embriões produzidos apresentaram melhora em seu desenvolvimento (Dellaqua et al., 2023).

Embora este meio de maturação seja mais fisiológico que o meio convencional que tem como base altas dosagens de FSH, a fase MIV do SF ainda pode ser aprimorada, uma vez que uma ativação sequencial dos indutores da cascata ovulatória pode representar melhor o ambiente folicular e promover maior sincronia núcleo-citoplasmática, favorecendo assim, a competência oocitária. Diante disso, o objetivo do presente estudo é avaliar o impacto de uma estimulação sequencial dos indutores da maturação (FSH e AREG) durante a MIV sobre progressão meiótica.

2 HIPÓTESE

A estimulação sequencial da cascata de maturação associada à NRG1 durante a MIV atrasa a retomada da meiose, o que pode melhorar a sincronia núcleo-citoplasmática e resultar em oócitos mais competentes para serem fecundados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de uma estimulação sequencial da cascata ovulatória durante a MIV de oócitos bovinos sobre a progressão meiótica.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes indutores da cascata ovulatória durante a MIV sobre a manutenção da vesícula germinativa;
- Avaliar o impacto da estimulação sequencial da cascata ovulatória durante a MIV de oócitos bovinos sobre a progressão meiótica;
- Avaliar o efeito deste sistema sequencial associado a suplementação de NRG1 na etapa final do procedimento sobre a progressão meiótica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Os efeitos da estimulação sequencial associada a NRG1 durante a MIV foram analisados em ao menos 4 réplicas experimentais em grupos de 20 COCs cultivados em 400 µL de meio por 6, 12 e 22 h para avaliação da progressão meiótica.

O meio de maturação base para todos os experimentos foi composto de TCM 199 com bicarbonato suplementado com piruvato (22 µL/mL), amicacina (75 µg/mL),

albumina sérica bovina (BSA, 4 mg/mL) e cisteamina (1 mM/mL); acrescido de rhFSH (0,1 UI/mL) para o grupo FSH, ou acrescido de r-hFSH (0,01 UI/mL), AREG (100 ng/mL), IGF-1 (10 ng/mL), 17 β -oestradiol (50 ng/mL) e progesterona (150 ng/mL) para o grupo SF (Sistema Folicular).

4.2 Experimento 1: Avaliação do efeito de diferentes indutores de maturação oocitária sobre a progressão meiótica

Para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a progressão meiótica após 6 h de MIV, utilizamos um meio convencional a base de altas dosagens de FSH (grupo FSH), um meio mais fisiológico a base de AREG e baixas dosagens de FSH (grupo SF) e outro meio com baixas concentrações de FSH e ausência de AREG (grupo SF-s/A). O meio do grupo SF-s/A é semelhante ao tratamento SF citado acima, mas sem a adição de AREG. Assim, COCs bovinos foram cultivados durante 6 horas e os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst para análise da progressão meiótica. Este experimento nos ajudou a compreender a ativação da cascata ovulatória nas 6 primeiras horas de maturação, o que nos motivou a prosseguir com a MIV sequencial no tratamento do sistema folicular.

4.3 Experimento 2: Impacto da estimulação sequencial associada à NRG1 durante a MIV sobre a progressão meiótica

Para investigar os efeitos de uma estimulação sequencial associada a NRG1 na MIV, utilizamos 4 grupos experimentais, em que FSH e SF foram os controles (sem alteração de meios durante a MIV); e S (MIV sequencial) e S+NRG1 (MIV sequencial + NRG1) foram os tratamentos sequenciais com alterações de meios durante a MIV. Para estes tratamentos sequenciais, utilizamos o meio SF-s/A durante as 6 primeiras horas da MIV. Após este período, os meios foram trocados para o meio SF acrescido de 1 ng/mL NRG1 (grupo S+NRG1) ou não (grupo S). Assim, COCs bovinos foram cultivados durante 12 e 22 horas e os oócitos foram desnudos e corados com Hoechst para análise microscópica da progressão meiótica.

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

Os ovários bovinos foram coletados de abatedouro local e 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 2 a 8 mm foi realizada com o uso de seringa de 10 mL e agulha 19G para obtenção dos COCs imaturos. O fluido 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, em grau I, II ou III, de acordo com suas características morfológicas (Khurana and Niemann, 2000). Somente COCs que apresentaram citoplasma íntegro/homogêneo e múltiplas camadas de CCs compactas foram selecionados para constituir os grupos experimentais a serem submetidos a MIV.

4.5 Maturação oocitária *in vitro* (MIV)

Após lavagem em meio TCM199 com HEPES contendo BSA (4 mg/mL) e amicacina (75 µg/mL), os grupos de COCs foram transferidos para a placa de maturação *in vitro*. As placas de maturação de 4 poços (NUNC®) foram previamente preparadas com 400 µL de meio de cultivo de acordo com cada tratamento proposto e após a transferência dos COCs, as placas foram colocadas em incubadora por um período de 6, 12 e 22 horas à temperatura de 38,5 °C e umidade saturada do ar com 5% de CO₂.

4.6 Análise da progressão meiótica

Ao final de cada período de MIV, os oócitos foram submetidos a sucessivas pipetagens para causar um turbilhonamento e remoção das CCs circundantes. Em seguida, os oócitos desnudos foram fixados em metanol 60% e corados com Hoechst 33342 entre lâmina e lamínula para avaliação do material genético. As lâminas foram visualizadas em microscópio com epifluorescência e o material genético foi classificado em vesícula germinativa (GV), quebra de vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), metáfase II (MII) e degenerados (DEG).

4.7 Análise Estatística

Os efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros descritos acima foram analisados por meio do software JMP (SAS Institute). Para isto, os dados foram transformados em arco-seno e analisados quanto a normalidade (Shapiro Wilk). Assim, os efeitos foram testados por ANOVA e as médias foram comparadas por Tukey ou Fisher. Os resultados estão apresentados por média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Em relação ao efeito de diferentes indutores de maturação oocitária sobre a manutenção da vesícula germinativa, observamos que o tratamento com AREG e baixas concentrações de FSH (grupo SF) acelerou a retomada da meiose, uma vez que este grupo apresentou maior porcentagem de quebra da vesícula germinativa comparado ao FSH ($p=0,0012$). Entretanto, o tratamento com baixas dosagens de FSH e ausência de AREG (grupo SF-s/A) não diferiu do controle FSH, onde ambos apresentaram a maioria dos oócitos no estágio de vesícula germinativa. Os resultados estão expressos na figura 1.

Ao avaliarmos o impacto da estimulação sequencial associada à NRG1 durante 12h de MIV sobre a progressão meiótica, observamos que não houve diferenças entre o tratamento S+NRG1 e os demais grupos, entretanto, os grupos SF e S diferiram do controle FSH ($p=0,0435$; figura 2), uma vez que estes apresentaram maiores porcentagens de oócitos em metáfase I. Por fim, não houve alterações na progressão meiótica após 22 horas de cultivo nos tratamentos avaliados ($p>0,05$; figura 3).

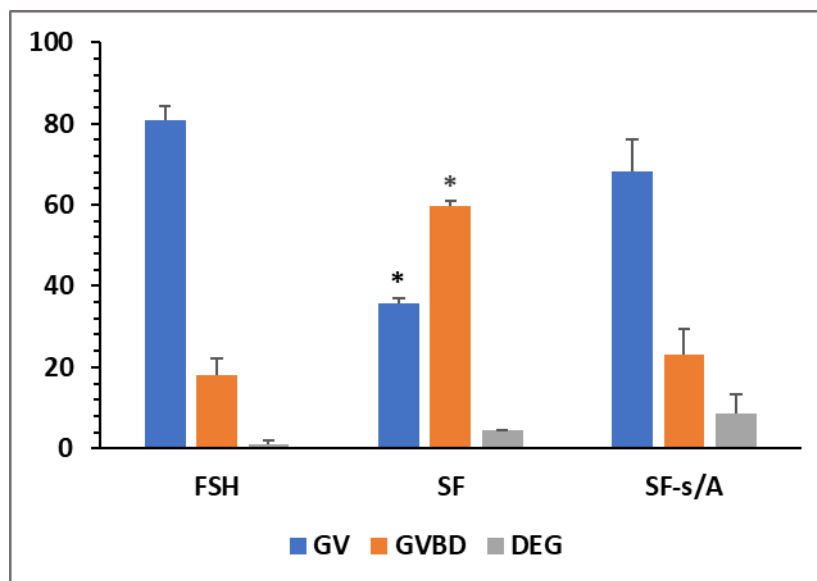


Figura 1: Efeitos de diferentes indutores de maturação oocitária sobre a progressão meiótica durante 6h de MIV. As barras em azul mostram a porcentagem de oócitos que permaneceram em vesícula germinativa (GV; $p=0,001$) e em laranja aqueles que atingiram a quebra da vesícula germinativa (GVBD, $p=0,0012$). As barras em cinza representam a porcentagem de oócitos degenerados (DEG; $p > 0,05$). Os resultados estão apresentados por média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com $p \leq 0,05$.

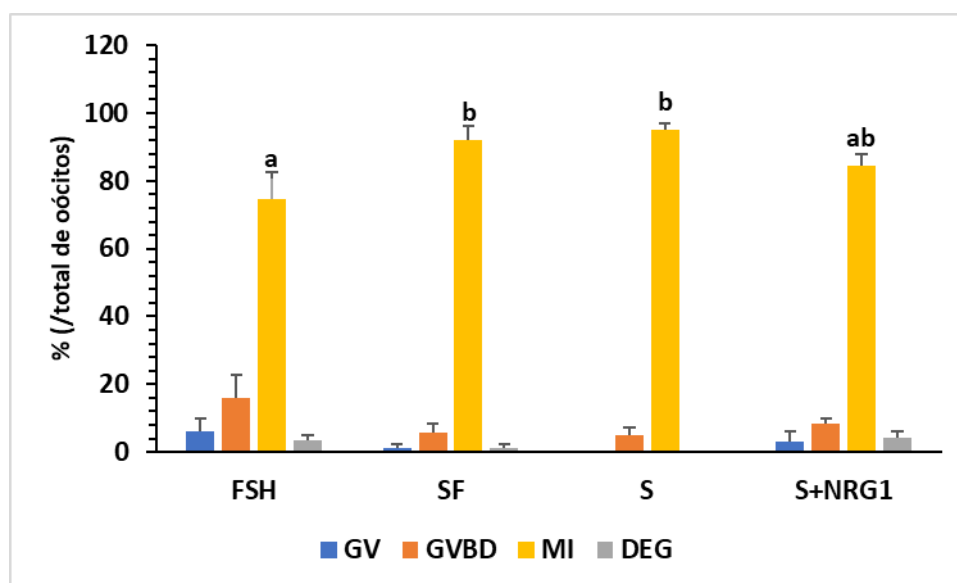


Figura 2: Efeitos de estimulação sequencial associada à NRG1 sobre a progressão meiótica durante 12h de MIV. As barras em azul mostram a porcentagem de oócitos que permaneceram

em vesícula germinativa (GV; $p > 0,05$) e em laranja aqueles que estavam em quebra da vesícula germinativa (GVBD; $p > 0,05$). Já as barras em amarelo representam os oócitos que progrediram para metáfase I (MI; $p = 0,0435$) e em cinza aqueles que estavam degenerados (DEG; $p > 0,05$). Os resultados estão apresentados por média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas com $p \leq 0,05$.

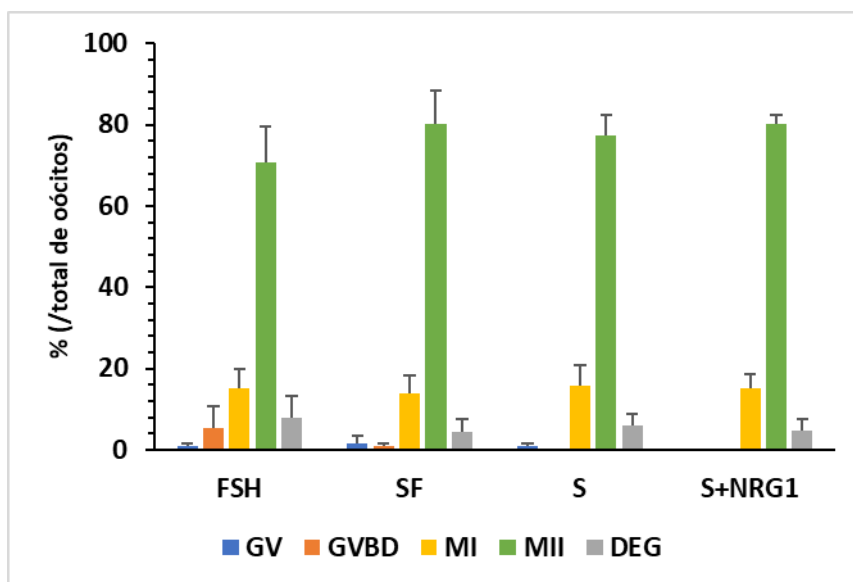


Figura 3: Efeitos de estimulação sequencial associada à NRG1 sobre a progressão meiótica durante 22h de MIV. As barras em azul mostram a porcentagem de oócitos que permaneceram em vesícula germinativa (GV) e em laranja aqueles que estavam em quebra da vesícula germinativa (GVBD). Já as barras em amarelo representam os oócitos que progrediram para metáfase I (MI) e em verde aqueles que alcançaram a metáfase II (MII). Os oócitos degenerados estão representados pelas barras cinzas (DEG). Os resultados estão apresentados por média $\pm$ erro padrão da média (EPM); $p > 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Avanços nos estudos de MIV sobre a fisiologia ovariana nos mostram a importância de tal etapa para aprimorar os protocolos vigentes de reprodução bovina, bem como agregar conhecimento nos procedimentos *in vitro* em humanos, uma vez que ambas as espécies apresentam semelhanças na dinâmica folicular (Webb et al., 2007; Orisaka et al., 2021). Quando a MIV acontece corretamente, melhores são os resultados da PIV de embriões, já que o oposto é um dos grandes fatores que reduz a taxa de embriões produzidos *in vitro* (Landim-Alvarenga and Maziero, 2014; He et al., 2021). A maturação

oocitária em mamíferos é estabelecida por sucessivos eventos que ocorrem desde o estágio de vesícula germinativa até a segunda divisão meiótica (BLANCO et al., 2011).

In vivo, a ovulação é dada pelo pico de LH que induz variadas mudanças nucleares e citoplasmáticas no oócito (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; SÁNCHEZ & SMITZ, 2012). Em sintonia, essas alterações garantem melhor competência oocitária para uma futura fecundação (KRISHER et al., 2004). Estudos anteriores mostraram que a NRG1 está presente nas células da granulosa e CCs (Shimada et al., 2016), que destina a modular a velocidade da ativação da cascata ovulatória pelas vias EGF-like e ERK1/2 (Falls, 2003; Noma et al., 2011; Shimada and Yamashita, 2011) ao reduzir os níveis de Ca^{+2} nas CCs, atrasando o tempo de maturação meiótica (Shimada et al., 2016). Outros estudos mostraram que o peptídeo AREG é um mediador parácrino do sinal de LH no folículo e estimula a expansão das CCs e a progressão da meiose (Park et al., 2004; Ashkenazi et al., 2005; Conti et al., 2006). No presente estudo, avaliamos o efeito de diversos tratamentos sobre a progressão meiótica a fim de melhorar a sincronia dos eventos ocorridos durante a maturação oocitária. Para isso, dois experimentos foram realizados para analisar a conformação do material genético.

Primeiramente, oócitos maturados com alta dosagem de FSH ou com baixa dosagem de FSH e ausência de AREG apresentaram uma maturação mais lenta durante 6 horas de cultivo, já que a maioria dos oócitos (80% e 68%, respectivamente) estavam no estágio de vesícula germinativa, no entanto, ao adicionar AREG no meio MIV com baixa dosagem de FSH ocorreu a progressão meiótica, onde foi encontrado mais de 55% de quebra da vesícula germinativa.

Isto pode ser justificado pelo fato de que o FSH induz a retomada da meiose a partir da expressão de fatores EGF-like, como a AREG (Freimann et al., 2004; Gilchrist, 2011), para então ativar as vias ERK1/2 e PKC nas CCs (Falls, 2003; Shimada and Yamashita, 2011). Entretanto, a ativação prematura dessas vias pode resultar em desbalanço da ovulação (Shimada et al., 2016), bem como da maturação oocitária. De acordo com isto, a adição de AREG desde o início da MIV pode acelerar a maturação nuclear, uma vez que induz diretamente a cascata ovulatória por meio da ligação com seus receptores, os EGFR, nas CCs. (Sugimura et al., 2014; Araujo, 2015). Assim, o presente estudo sugere que não seja necessário a introdução do peptídeo AREG nas primeiras horas de MIV, para que não haja precipitação da progressão meiótica neste momento, já que o hormônio FSH pode induzir gradualmente a produção de AREG para então, ativar completamente a cascata ovulatória. Como observado, a retomada da meiose ocorre mais lentamente ao

utilizar alta e baixa dosagem de FSH nas fases iniciais da MIV. Diante disso, o uso adequado dos indutores de maturação oocitária desde o início da MIV pode melhorar a sincronia da maturação nuclear e citoplasmática, resultando em oócitos de melhor qualidade. Com base nesses resultados e a fim de ajustar a retomada da meiose com a maturação citoplasmática no sistema folicular, adotamos o uso de uma estimulação sequencial durante a MIV.

A partir disto, observamos que a maturação induzida com AREG (grupo SF) e o uso sequencial dos indutores da MIV (6h horas com baixa dosagem de FSH seguido de 6h com AREG, grupo S) aumentou a porcentagem de oócitos em metáfase I após 12 horas de cultivo, diferindo dos oócitos estimulados com alta dosagem de FSH. Embora a NRG1 tenha ação moduladora da sinalização dos EGFR, principalmente AREG, neste estudo, quando adicionamos NRG1 na estimulação sequencial (grupo S+NRG1) não houve diferença com os demais tratamentos. Isto pode ser justificado pelo tempo de maturação, uma vez que a maioria dos oócitos já estavam em metáfase I em todos os grupos após 12 horas de cultivo (acima de 70%). Possivelmente, uma análise anterior a este momento da MIV poderia ressaltar melhor atuação da NRG1 durante este processo. Além disso, estudos anteriores já ressaltaram a eficácia da NRG1 quanto a modulação da maturação oocitária em camundongos (Noma et al., 2011; Kawashima et al., 2014), suínos (Mao et al., 2012) e bovinos (Dellaqua et al., 2023).

Outro fato importante observado neste estudo é que, ao final de 22 horas de MIV, a maioria dos oócitos estavam em metáfase II em todos os tratamentos testados (acima de 77%), estágio em que o oócito está apto para ser fecundado. Apesar deste estudo não apresentar aumento nas taxas de metáfase II, não descartamos a hipótese de que o uso sequencial dos indutores da maturação oocitária associada a NRG1 pode melhorar a qualidade oocitária, se aproximando cada vez mais dos eventos fisiológicos, bem como resultar em melhor desenvolvimento embrionário. Novos estudos são necessários para avaliar tais efeitos em outros parâmetros, como avaliar a influência deste novo sistema a nível molecular e de expressão dos genes, além de testar na PIV. Aqui ressaltamos a importância do aprofundamento em pesquisas sobre a maturação oocitária, a fim de aprimorar os protocolos vigentes e consequentemente maximizar o uso dos oócitos recuperados para melhores taxas de produção embrionária e qualidade dos embriões.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que a estimulação através do modelo sequencial proposto neste estudo durante a MIV de oócitos bovinos mantém a parada meiótica até 6 horas de maturação e progride normalmente à metáfase II, o que pode melhorar a comunicação *cumulus*-oócito e favorecer ao posterior desenvolvimento embrionário. Embora não observamos efeitos significativos da NRG1 neste sistema, acreditamos que sua adição ao meio traz benefícios para a qualidade oocitária, assim, mais estudos são necessários para avaliar seu potencial neste sistema sobre marcadores regulatórios e de competência oocitária, bem como ser aplicado na PIV de embriões bovinos

8 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

BANERJEE, S.; MISHRA, S.; XU, W.; THOMPSON, W.E.; CHOWDHURY, I. Neuregulin1 signaling regulates cytokines and chemokines expression and secretion in granulosa cell. *Journal of Ovarian Research*, v. 15, p. 86, 2022.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MILEWSKI, R.; KUC, P.; KUCZYNSKA, A.; STANKIEWICZ, B.; LUKASZUK, K.; KUCZYNSKI, W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic

parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 32, p. 571-579, 2015.

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

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

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