

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DE  
BOTUCATU**

**Expressão gênica de células do cumulus e oócitos bovinos submetidos à  
maturação *in vitro* com diferentes macromoléculas, EGF e  
Butirolactona I**

**Diego Gouvêa de Souza**

**BOTUCATU-SP**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DE  
BOTUCATU**

**Expressão gênica de células do cumulus e oócitos bovinos submetidos à  
maturação *in vitro* com diferentes macromoléculas, EGF e  
Butirolactona I**

**Diego Gouvêa de Souza**

**Tese apresentada junto ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal  
da FMVZ – UNESP, Botucatu, para  
obtenção do título de Doutor**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Oba**

**Coorientador: Prof. Adjunto Alicio Martins Júnior**

**BOTUCATU-SP**

**2014**

Nome do Autor: Diego Gouvêa de Souza

Título: Expressão gênica de células do cumulus e oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* com diferentes macromoléculas, EGF e Butirolactona I

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Eunice Oba

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Membro

Departamento de Veterinária

UFV- Viçosa, MG

Prof. Álan Maia Borges

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

UFMG – Belo Horizonte, MG

**Data da defesa: 04 de dezembro de 2014**

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

## **Dedicatória**

A Deus, por estar presente em minha vida em todos os momentos.

Aos meus pais, esposa e amigos que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização desta fase da vida.

## Agradecimentos

A Deus, por tudo;

Aos meus pais pela educação, formação e amor que sempre me deram, sendo auxílio fundamental em mais esta fase da minha vida.

À minha esposa, Sabrina Cruz Tfaille Frasnelli, pelo amor, paciência e apoio incondicional.

À orientadora Professora Dra. Eunice Oba, por ter dado a oportunidade e orientação neste trabalho, sem o qual não seria possível sua realização.

Ao orientador e amigo, Professor Adjunto Alicio Martins Júnior, não só pela orientação e ensinamentos profissionais, mas também pela amizade e sinceridade constantes, digna da minha total admiração pessoal e profissional.

À amiga Fernanda Nunes, por colaborar expressivamente para a realização deste trabalho.

À professora Cynthia Ludovico Martins do departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, pela disponibilização dos animais e das instalações da fazenda Edgárdia.

À Andressa Nogueira Vilas Boas e minha esposa Sabrina Cruz Tfaille Frasnelli da faculdade Odontologia da UNESP de Araraquara, pelo apoio técnico na realização da PCR.

À funcionária Magna do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba

À UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu, curso de pós-graduação, por proporcionar a oportunidade de realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Bolsa de Doutorado: 2011/ 20514-3).

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I

**QUADRO 1:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, estrutura celular analisada, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento..... 44

### CAPÍTULO II

**QUADRO 1:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, estrutura celular analisada, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento.....64

### CAPÍTULO III

**QUADRO 1:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, estrutura celular analisada, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento..... 83

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**FIGURA 1:** Comparação da abundância de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo SFB, BSA ou PVA, oócitos maturados *in vivo* (MIVO) e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ )..... 46

**FIGURA 2:** Comparação entre a abundância de transcritos GREM1, AREG e PTGS2 nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo SFB, BSA ou PVA, e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 47

**FIGURA 3:** Quantidade relativa de transcritos de GDF9, BMP15 e OOSP1 entre oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo SFB, BSA ou PVA, oócitos MIVO e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 47

### CAPÍTULO II

**FIGURA 1:** Comparação da abundância de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de EGF (EGF0, 0 ng/mL; EGF10, 10 ng/mL; EGF100, 100 ng/mL), oócitos maturados *in vivo* (MIVO) e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 66

**FIGURA 2:** Comparação da abundância de transcritos GREM1 e AREG nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de EGF (EGF0, 0 ng/mL; EGF10, 10 ng/mL; EGF100, 100 ng/mL) e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 67

**FIGURA 3:** Quantidade relativa de transcritos de GDF9, BMP15 e OOSP1 entre oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de EGF (EGF0, 0 ng/mL; EGF10, 10 ng/mL; EGF100, 100 ng/mL) oócitos maturados *in vivo* (MIVO) e oócitos imaturos (VG) Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 67

### CAPÍTULO III

**FIGURA 1:** Comparação entre os níveis de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro* na ausência (BL0) ou presença de bloqueio meiótico com BLI (BL12, 12 h de bloqueio da meiose e MIV; BL24, 24 h de bloqueio da meiose e MIV) e oócitos maturados *in vivo* (MIVO) ou oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 85

**FIGURA 2:** Comparação entre os níveis de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro* na ausência (BL0) ou presença de bloqueio meiótico com BLI (BL12, 12 h de bloqueio da meiose e MIV; BL24, 24 h de bloqueio da meiose e MIV) e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 86

**FIGURA 3:** Comparação entre os níveis de transcritos de GDF9, BMP15 e OOSP1 nos oócitos maturados *in vitro* na ausência (BL0) ou presença de bloqueio meiótico com BLI (BL12, 12 h de bloqueio da meiose e MIV; BL24, 24 h de bloqueio da meiose e MIV) e oócitos maturados *in vivo* (MIVO) ou oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ) ..... 86

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 MEIOS DE CULTIVO DE OÓCITOS .....	16
2.2 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MIV COM HORMÔNIOS .....	17
2.3 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MIV COM FLUIDO FOLICULAR .....	18
2.4 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MIV COM FATORES DE CRESCIMENTO .....	19
2.5 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MIV COM MACROMOLÉCULAS .....	20
2.6 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE MIV COM AMINOÁCIDOS E ANTIOXIDANTES .....	21
2.7 PRÉ-MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS COM BLOQUEADORES MEIÓTICOS .....	23
3. OBJETIVOS .....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
5. CAPÍTULO I .....	36
6. CAPÍTULO II .....	56
7. CAPÍTULO III .....	75
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95
9. ANEXOS .....	96

**SOUZA, D.G. Expressão gênica de células do cumulus e oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* com diferentes macromoléculas, EGF e butirolactona I.** Botucatu, 2014. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi quantificar a abundância de genes associados com a competência de desenvolvimento em oócitos (GDF-9, BMP15 e OOSP1) e nas células do cumulus (GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 e ADAM17), a partir de oócitos imaturos (VG), maturados *in vivo* (MIVO) e cultivados em meio de MIV com diferentes macromoléculas (SFB, BSA ou PVA), diferentes concentrações de EGF ou pré-cultivados com butirolactona I (BLI) antes da MIV. O delineamento experimental consistiu de três experimentos de MIV de oócitos bovinos, a saber: experimento 1, complexos cumulus-oócito maturados em meio de cultivo contendo 10% de SFB ou 1 mg/mL de PVA ou 4 mg/mL de BSA; experimento 2, complexos cumulus-oócito maturados em meio de cultivo contendo EGF (nas concentrações de 0, 10 e 100 ng/mL); e experimento 3, complexos cumulus-oócito maturados *in vitro* na ausência (BL0) ou presença de pré-maturação com 10 µM de BLI (BL12, 12 horas de pré-maturação e 12 horas de MIV; BL24, 24 horas de pré-maturação e 24 horas de MIV). A quantidade relativa de transcritos para o gene GREM1, PTGS2, PFKP e AREG foi maior do que ( $P < 0,05$ ) nas células do cumulus de oócitos MIVO, nos experimentos 1 e 2 e para o gene GREM1 no experimento 3. No experimento 1, o grupo SFB exibiu maior ( $P < 0,05$ ) abundância de transcritos de GREM1 e AREG entre os grupos MIV. No experimento 2, a adição de 10 ng/mL ao meio de MIV propiciou uma regulação positiva de EREG. No experimento 3, BL12 apresentou maior ( $P < 0,05$ ) abundância de AREG e o BL24 de EREG e PTX3. Entre os grupos de MIV, o gene GREM1 foi expresso em maior quantidade ( $P < 0,05$ ) no BL12. Não houve diferença estatística nos experimentos 1, 2 e 3 entre os grupos de oócitos MIV, MIVO e VG para os genes GDF9, BMP15 e OOSP1. Conclui-se que, a utilização de diferentes macromoléculas, diferentes concentrações de EGF e a realização de pré-cultivo com BLI altera a transcrição nas células do cumulus de genes associados à competência oocitária.

**Palavras - chave:** MIV, mRNA, competência oocitária.

**SOUZA, D.G. Gene expression of cumulus cell and bovine oocytes submitted to *in vitro* maturation with different macromolecules, EGF and butyrolactone I.** Botucatu, 2014 Tese (doutorado) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Sao Paulo State University.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to quantify the abundance of genes associated with the development of oocyte competence in oocytes (GDF-9, BMP15 and OOSP1) and in cumulus cells (GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 and ADAM-17) of immature oocytes (GV), *in vivo* matured (IVMO) and cultured in IVM medium with different macromolecules (FCS, BSA or PVA), different EGF concentrations or pre-cultured with butyrolactone I (BLI) before IVM. The experimental design consisted of three IVM experiments of bovine oocytes, namely: experiment 1, cumulus-oocyte complex matured in culture medium containing 10% FCS or 1 mg/mL PVA or 4 mg/mL BSA; Experiment 2, cumulus-oocyte complex matured in culture medium containing EGF (at concentrations of 0, 10 and 100 ng/mL); and Experiment 3, cumulus-oocyte complex *in vitro* matured in the absence (BL0) or presence of pre-maturation with 10  $\mu$ M de BLI (BL12, 12 hours of pre-maturation and 12 hours of IVM, BL24, 24 hours of pre-maturation and 24 hours of IVM). The relative amount of transcripts for GREM1, PTGS2, PFKP and AREG gene was larger than ( $P < 0.05$ ) in cumulus cells of IVMO oocytes in experiments 1 and 2 and for GREM1 gene in experiment 3. In experiment 1, the FCS group exhibited higher ( $P < 0.05$ ) abundance of transcripts of GREM1 and AREG among MIV groups. In experiment 2, the addition of 10 ng/ml to the IVM medium provided an upregulation of EREG. In experiment 3, BL12 showed higher ( $P < 0.05$ ) abundance of AREG and BL24 of EREG and PTX3. Among IVM groups, the GREM1 gene was expressed in larger quantities ( $P < 0.05$ ) in BL12. There was no statistical difference in experiments 1, 2 and 3 among groups of oocytes IVM, IVMO and GV for GDF9, BMP15 and OOSP1 genes. It was concluded that the use of different macromolecules, different EGF concentrations and the performance of pre-culture with BLI change the transcription in the cumulus cell of genes associated with oocyte competence.

**Key words:** IVM, mRNA, oocyte competence.

*Introdução*

## 1. Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma importante biotécnica de reprodução assistida aplicável em mamíferos domésticos de interesse econômico, podendo ser utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que impeçam a reprodução de forma natural ou via transferência de embriões (GONÇALVES et al., 2007).

A capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário depende da maturação nuclear e citoplasmática do oócito (CRITSER et al., 2006). A maturação inadequada do oócito, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU; BRACKET, 1988).

Em condições *in vivo*, a maturação oocitária é um processo induzido, através do qual o aprisionamento meiótico, mediado pelo AMP cíclico, é sobrepujado pela onda de gonadotrofina antes da ovulação (GILCHRIST et al., 2010). Em comparação com os oócitos maturados *in vivo*, os quais ainda estão em processo de adquirir competência para o desenvolvimento, oócitos maturados *in vitro* sofrem maturação prematura, sendo que a cascata molecular, a qual dá reinício à meiose, difere daquela que ocorre *in vivo* (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Assim, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena capacitação oocitária (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

A maturação oocitária é definida como o reinício e término da primeira divisão meiótica até a fase de metáfase II, acompanhada da maturação citoplasmática necessária para a fertilização e desenvolvimento embrionário (CHA; CHIAN, 1998).

A maturação final do oócito é de natureza dinâmica, sendo que os complexos cumulus-oócito (CCO) requerem diferentes componentes, tais como: ácidos graxos, aminoácidos, eletrólitos, purinas, pirimidinas e metabólitos. Os CCO que atingem a maturação consomem duas vezes mais glicose, oxigênio e piruvato do que os imaturos (SUTTON et al., 2003).

Sendo assim, a eficiência do procedimento de maturação *in vitro* (MIV) está limitada a uma intrínseca competência para o desenvolvimento do oócito, implicando em alterações moleculares e bioquímicas que permitam ao oócito maturado ser

fertilizado normalmente e se tornar um embrião, o qual após transferência possa se desenvolver a termo (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

Durante a aquisição de competência, as mitocôndrias sintetizam ATP necessário para a síntese protéica durante a maturação e, posterior, desenvolvimento embrionário (Krisher; Bavister, 1998). De acordo com Yurttas et al. (2010), os oócitos transcrevem e estocam uma grande quantidade de material que não tem papel seletivo na oogênese, mas, ao contrário, são importantes para a regulação da embriogênese. A ativação da transcrição do genoma embrionário é requerida para o desenvolvimento além do estágio de transição materno-zigoto (BARNES; FIRST, 1991). Além disso, o oócito secreta fatores que permitem a diferenciação das células murais da granulosa em células do cumulus, das quais recebe nutriente e sinais regulatórios que facilitam a progressão da maturação, especialmente, da maturação nuclear (GILCHRIST et al., 2004).

Desta forma, a etapa de MIV é crítica e o meio de maturação assume papel essencial no estabelecimento de um ambiente altamente propício para que o oócito adquira condições para ser fertilizado e, conseqüentemente, continuar o desenvolvimento embrionário. Segundo Córdova et al. (2010), a competência do oócito pode ser melhorada através da adição de substâncias promotoras de crescimento ao meio de cultura (gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento), embora, mesmo assim, a produção de blastocistos raramente ultrapassa a taxa dos 50% (THOMPSON, 2000); outra tentativa usual é a mimetização das condições intrafoliculares durante a etapa de aprisionamento meiótico. Contudo, os oócitos submetidos à MIV, embora sejam capazes de atingir altas taxas de maturação nuclear, possuem tempo insuficiente para sofrer uma maturação citoplasmática normal (CÓRDOVA et al., 2010).

A utilização de glicose, lactato, piruvato e aminoácidos são pré-requisitos para a elaboração de meios de maturação de oócitos bovinos (ORSI et al., 2005). Entretanto, a adição de gonadotrofinas, estradiol, fatores de crescimento e antioxidantes são necessários para aprimoramento da MIV (RAHIM et al., 2011). Assim, o estabelecimento de meios de maturação e/ou condições mais eficientes para induzir completa competência oócitaria tem sido essencial para a posterior obtenção de melhores resultados na PIV. Dessa forma, a avaliação da expressão gênica assume importância como ferramenta para analisar a qualidade do oócito frente a condições *in vitro* e *in vivo*. Contudo, há poucos relatos dos efeitos da inibição meiótica com butirolactona I e da influência de diferentes macromoléculas e concentrações de EGF,

em meio de MIV de oócitos bovinos, sobre a expressão gênica em oócitos e células do cumulus.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Meios de cultivo de oócitos**

Diversos meios de cultivo comerciais são comumente usados como base para os sistemas de MIV, tais como: TCM199, Waymouth MB 752/1, Ham's F-12, Minimum Essential Medium (MEM) e Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) (SUTTON et al., 2003).

Os diferentes meios base podem possuir distintas concentrações de íons e substratos energéticos, podendo haver a necessidade de suplementação energética e ajustes devido à mudança de osmolaridade e/ou pH (GANDHI et al., 2000).

O TCM199, meio comercial padrão para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (WATSON et al., 2000; GANDHI et al., 2000), é um meio complexo, o qual não foi elaborado especificamente para o cultivo de embrião, sendo assim, provavelmente, não possui concentrações ideais de componentes necessários para suportar uma adequada maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (WATSON et al., 2000).

Oócitos bovinos maturados em TCM 199 e MEM têm índices de desenvolvimento de blastocisto superiores (12 - 19%) em comparação com oócitos maturados em Waymouth MB 752/1 (3%) e Ham's F-12 (1%) (SUTTON et al., 2003).

A maturação de oócitos em TCM 199, suplementado com SFB e gonadotrofinas, permite que aproximadamente 80% de oócitos imaturos alcancem o estágio de metáfase II (DOMINKO; FIRST, 1997). Porém, somente 15 a 40% dos oócitos fertilizados alcançam o estágio de blastocisto (WARD et al., 2002). Como alternativa ao meio TCM, outros meios base têm sido utilizados. Assim, Gliedt et al. (1996) testaram na MIV de oócitos bovinos os meios TCM e RPMI-1640 suplementados com soro de vaca no estro (20%); observaram superioridade do meio TCM no grau de expansão de células do cumulus, bem como na produção de mórulas.

Da mesma forma, o meio de cultura de embriões SOF (“Synthetic oviductal fluid”) tem sido empregado na MIV de oócitos, no entanto com resultados divergentes (LONERGAN et al., 1994; GANDHI et al., 2000; WATSON et al., 2000). O SOF foi

originalmente baseado na análise bioquímica do fluido tubárico de ovinos (TERVIT et al., 1972). Gandhi et al. (2000), utilizando o meio SOF + SFB para MIV de oócitos bovinos, obtiveram taxa de produção de embriões similar (20,9%) em comparação com TCM + SFB (27,3%), porém, com menor taxa de blastocistos eclodidos (6,1 vs. 12,8%, respectivamente).

Watson et al. (2000) demonstraram que o meio cSOFMaa (cSOFM + “single-strength essential” [EAA] e “nonessential [NEA] aminoacids”) foi eficaz tanto para cultura de embrião quanto para a MIV de oócitos bovinos, em comparação com os meios TCM 199 + 10% de “newborn calf serum” (NCS), cSOFM + 10% NCS e cSOFM. Entretanto, Lonergan et al. (1994) não observaram efeito benéfico sobre a maturação de oócitos bovinos cultivados em meio SOF em relação ao TCM.

Recentemente, Caldeira et al. (2014), utilizando o meio “Beltisville Agriculture Research Center” (BARC), como meio base para maturação *in vitro* de oócitos bovinos, verificaram menor taxa de produção de blastocistos quando comparado aos oócitos cultivados em TCM. O meio BARC tem sido utilizado, na prática, para o cultivo de embriões produzidos a partir de transferência nuclear de células somáticas (GIBBONS et al., 2002) ou para o cultivo de embriões em procedimento usual de PIV (MARTINS Jr. et al., 2003; PASCHOAL et al., 2006; FERRO et al., 2009).

## 2.2 Suplementação do meio de MIV com hormônios

As gonadotrofinas são reguladoras primárias da maturação nuclear oócitaria de mamíferos *in vivo* (LORENZO et al., 1994). São largamente empregadas na forma de preparações biológicas purificadas, quando comparadas com as gonadotrofinas recombinantes. Estas, por sua vez, foram utilizadas primeiramente por Martins Jr. et al. (1998), os quais demonstraram a habilidade tanto do r-hFSH como do r-hLH na maturação funcional de oócitos bovinos, evidenciada pelo desenvolvimento embrionário comparável com o meio de MIV contendo gonadotrofinas biológicas provenientes de pituitária ovina ou bovina (oFSH, NIDDK-o-FSH-17; b-LH, USDA-bLH-B-6).

O uso do  $17\beta$ -estradiol na rotina da MIV tem efeitos questionáveis (BEKER et al., 2002). Beker et al. (2002) verificaram que, na presença do FSH, a adição do estradiol não propiciou efeito positivo sobre a taxa de clivagem e formação de

blastocisto. Entretanto, Ali e Sirard (2002) observaram um aumento de mórula e blastócitos, quando este foi em meio definido.

Coelho et al. (2002) e Cebrian-Serrano et al. (2013) substituíram em meio de maturação de bovinos o FSH e o LH por eCG e hCG, respectivamente. O eCG é uma molécula glicoproteica com atividade tanto de FSH quanto de LH, embora sua ação predominante seja de FSH (COELHO et al., 2002). A substituição em meio de cultura do LH pelo hCG, os quais possuem estruturas químicas semelhantes, parece ser um alternativa que poderia minimizar os custos, tornando a produção de embriões mais rentável (BALTAR et al., 2000). Segundo Coelho et al. (2002), a substituição de FSH/LH por eCG/hCG não ocasionou diferença entre os tratamentos com relação a taxa de clivagem e blastocisto.

A adição de outros hormônios, entre eles a insulina, em meio de MIV, foi investigada por Matsui et al. (1995), sendo que a suplementação da mesma somente foi efetiva na ausência de SFB, FSH e 17 $\beta$ - estradiol.

### **2.3 Suplementação do meio de MIV com fluido folicular**

O fluido folicular é um compartimento avascular dentro do ovário dos mamíferos que fornece um microambiente muito importante para o desenvolvimento dos oócitos (REVELLI et al., 2009; KOR et al., 2013).

O efeito da suplementação no meio de maturação com fluido folicular foi investigada por Kim et al. (1996) e Romero-Redondo e Seidel (1996). Os níveis de estradiol e LH no fluido folicular, em bovinos, são alterados conforme o desenvolvimento do folículo, sendo que no final do seu desenvolvimento estimula a maturação do oócito (KIM et al., 1996). Inicialmente, o oócito é mantido em bloqueio meiótico no folículo, sendo que, após a onda pré-ovulatória de LH, o mesmo é induzido à retomada da meiose (ROMERO-REDONDO; SEIDEL, 1996).

Embora o fluido folicular não diluído seja ineficiente para suportar a MIV de oócitos bovinos, tem sido utilizado para complementar o meio de cultivo em variados graus de sucesso em sistemas de MIV em oócitos equinos, bovinos e suínos, com as taxas de maturação de oócitos sendo afetadas pela fase do ciclo estral e tamanho do folículo (ORSI et al., 2005).

A suplementação de fluido folicular proveniente de folículos pré-ovulatórios tem dado suporte à maturação nuclear e citoplasmática do oócito (KIM et al., 1996). Oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio com fluido folicular coletado 20 h após o pico de LH apresentaram taxas de clivagem e blastocistos maiores do que os grupos maturados em meio sem a presença de fluido folicular ou suplementado com fluido folicular obtido no momento do pico de LH (ROMERO-REDONDO; SEIDEL, 1996). Kim et al. (1996) constataram que a adição de fluido folicular proveniente de pequenos folículos no meio de MIV permitiu a maturação dos oócitos bovinos, quando suplementado com estradiol.

#### **2.4 Suplementação do meio de MIV com fatores de crescimento**

Os fatores de crescimento produzidos pelas células durante o desenvolvimento folicular, tais como: fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblásto (FGF), fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), têm sido testados durante maturação *in vitro* e proporcionaram a capacitação de oócitos (GONÇALVES et al., 2007).

O EGF é um peptídeo que atua estimulando a proliferação de células epiteliais (BUCCIONE et al., 1990). No folículo ovariano, estimula a mitose das células foliculares (granulosa/teca), induz o crescimento do oócito, mantém a viabilidade folicular, favorece a produção de esteróides, promove a expansão das células do cumulus e, ainda, exerce papel determinante na maturação nuclear e citoplasmática do oócito. (SILVA et al., 2010).

Lonergan et al. (1996) demonstraram que a suplementação do meio de MIV com EGF, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 ng/mL), estimulou a expansão das células do cumulus, aumentou a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII, bem como a proporção de embriões bovinos que chegaram ao estágio de blastocisto.

O IGF-I é um potente mitógeno das células da granulosa, o qual mesmo na ausência do FSH, atua como um amplificador da ação biológica do FSH no ovário (LORENZO et al., 1994), agindo também como um supressor de apoptose (ZHANDI et al., 2009).

Herrler et al. (1992) observaram que a adição de 50 ng/mL de IGF-I no meio de maturação melhorou a qualidade dos embriões produzidos, mas não aumentou a taxa de mórula e blastocisto.

O FGF tem habilidade de regular o desenvolvimento folicular e a maturação dos oócitos (ZHANG et al., 2010). As células da granulosa produzem o FGF, mais notavelmente o FGF2, que está relacionado com o desenvolvimento do folículo primordial, com a proliferação de células da granulosa e com a expressão de receptor de LH (ZHANG et al., 2010). Zhang e Ealy (2012) observaram que utilização de 0,5, 5 ou 50 ng/ml de FGF2 no meio de MIV promoveu a formação de blastocisto, não afetando a expansão das células do cumulus e nem a abundância relativa de transcritos que codificam fatores reguladores da expansão (EGFR, FSHR, HAS).

O GDF9 e a BMP15 são fatores secretados pelo oócito com influência na foliculogênese e possuem papel importante na comunicação oócito-células foliculares e na expansão das células do cumulus durante o processo de maturação (PEREIRA et al., 2010; BESSA et al., 2013; ROY et al., 2013). Hussein et al. (2006) suplementaram o meio de MIV com BMP15, GDF9 ou os dois combinados e observaram aumento da proporção de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto de 41% (controle) para 58%, 50% e 55%, respectivamente.

## **2.5 Suplementação do meio de MIV com macromoléculas**

As fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para a PIV de embriões bovinos são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) (MINGOTI et al., 2002), porém, as fontes de origem animal podem ser veículo para agentes infecciosos e tóxicos para o embrião (GARDNER, 1994), além de possuir compostos indefinidos, os quais, quando utilizados no cultivo embrionário, alteram a criotolerância e a abundância relativa de transcritos (RIZOS et al., 2002).

A BSA possui como contaminante embriotrófico o citrato (GRAY et al., 1992), que atua também como agente quelante de metais (CHENBERK; MARTELL, 1959), podendo estar contaminado com diversos peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento (KANE, 1985). Além disso, diferentes partidas de BSA, disponíveis comercialmente, podem inibir ou estimular o desenvolvimento embrionário (PINYOPUMMINTR; BAVISER, 1994). O BSA tem sido comumente substituído por

macromoléculas sintéticas, álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP), quando meios quimicamente definidos são desejados (KESKINTEPE et al., 1995). Estudos indicam a utilização de meios quimicamente definidos, porém, produzem taxas de formação de blastocistos viáveis mais baixas (KORKONE et al., 2010).

Gandhi et al. (2000), utilizando o meio SOF + BSA para a MIV de oócitos bovinos, obtiveram taxa de produção de embriões similar (24,1%), quando comparada com o meio SOF + SFB (20,9%) e TCM + SFB (27,3%). Observaram, entretanto, menor número de células nos blastocistos cultivados no meio SOF + BSA, em comparação com o meio SOF + SFB, além de menor expansão das células do cumulus.

Ali e Sirard (2002), comparando diferentes suplementos proteicos (BSA-V, BSA purificada, BSA-FAF, albumina de ovo de galinha e SFB), além de macromoléculas sintéticas (PVA e PVP-40 e PVP-360), adicionados ao meio SOF, verificaram que, a presença de PVP-40 (8 mg/mL), durante a MIV de oócitos bovinos, aumentou significativamente a produção de mórula e blastocisto, embora o SOF desprovido de tais aditivos, tenha possibilitado a maturação do oócito. Da mesma forma, a descrição da utilização de BSA-FAF (8 mg/mL) no meio base SOF, para MIV, foi relatada por Furnus et al. (2008). No entanto, Russell et al. (2006) observaram maior produção de blastocistos e maior número total de células em oócitos maturados em meio TCM suplementado com SFB do que em SOF com BSA.

## **2.6 Suplementação do meio de MIV com Aminoácidos e Antioxidantes**

Os aminoácidos podem atuar como substratos energéticos, reguladores de pH, osmólitos intracelulares, precursores de proteínas e ácidos nucleicos (LEE; FUKUI, 1996). Sua suplementação em meio de maturação de oócito foi associada ao aumento da taxa de desenvolvimento embrionário, aumento do número de células no blastocisto, e níveis elevados de transcritos maternos em oócitos (WATSON et al., 2000).

O estresse oxidativo, devido aos níveis de oxigênio suprafisiológicos, pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode comprometer o oócito e o cultivo de embriões, por isso, nos sistemas de PIV têm-se buscado a redução do nível de oxigênio (MERTON et al., 2013). Tem sido sugerido que ROS podem participar na prisão meiótica do oócito e têm sido implicados como uma das principais causas na deficiência de desenvolvimento embrionário e morte celular (CETICA et al., 2001).

Radicais livres, ROS e oxidantes têm sido usados no meio científico para identificar os intermediários químicos reativos oriundos do metabolismo do oxigênio, entre eles: o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), conforme Maia e Bicudo (2009).

A glutathiona (G- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina; GSH) é o principal composto sulfidrilo não proteico em células de mamíferos. Desempenha papel crítico na proteção da célula contra danos oxidativos, melhorando a formação do pró-núcleo masculino e descondensação da cromatina, regulação de proteína e síntese de DNA e preservação do fuso meiótico através da alteração do estado redox (RAHIM et al., 2011).

A adição de cisteamina, cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol e cistina ao meio de maturação aumenta a síntese de GSH em oócitos durante a MIV, elevando os níveis de GSH intracelular e melhorando o desenvolvimento e a qualidade dos embriões bovinos (MATOS et al., 1997; BALASUBRAMANIAN; RHO, 2007; RAHIM et al., 2011).

O  $\beta$ -mercaptoetanol e a cisteamina reduzem a cistina em cisteína, garantindo a síntese de glutathiona (BALASUBRAMANIAN; RHO, 2007). A cisteamina, um composto de tiol de baixo peso molecular, reagindo com a cisteína e, possivelmente, com a cistina, por intercâmbio sulfidrila-dissulfeto, forma dissulfeto misto (BALASUBRAMANIAN; RHO, 2007). Adicionando 0,1 mM de cisteamina durante a MIV, Merton et al. (2013) obtiveram um aumento significativo na taxa de produção de embriões (24,0% vs. 19,4%).

A cisteína é um aminoácido muito instável, um tiol tripéptido sintetizado pelo ciclo da  $\gamma$ -glutamil, importante componente da GSH (RAHIM et al., 2011). A concentração de cisteína no TCM 199 utilizado na rotina para a cultivo de embriões bovinos é muito baixa (0,6 M) em comparação com a cistina (83,2 M) (BALASUBRAMANIAN; RHO, 2007). Além disso, a cisteína em baixas concentrações no meio pode ser oxidada completamente em cistina (BALASUBRAMANIAN; RHO, 2007). Rahim et al. (2011) adicionaram 500  $\mu$ M de cisteína em meio de maturação com TCM 199 e obtiveram aumento na taxa de maturação em relação ao grupo controle (53,33% vs. 33,33%, respectivamente).

Silva et al. (2009) investigaram a adição da taurina ou glicina na MIV de oócitos bovinos. A taurina é conhecida como o principal componente do “pool” de aminoácidos livres encontrado no fluido do trato reprodutivo feminino, estando também presente em

oócitos e embriões de mamíferos (GUERIN; MÉNÉZO, 1995). Dentre suas funções biológicas, destacam-se a neutralização de aldeídos citotóxicos produzidos durante a reação de peroxidação lipídica, a modulação de cálcio (BOATMAN, 1997) e a estabilização da membrana (HUXTABLE, 1992; TIMBRELL et al., 1995). A glicina age como reguladora da osmolaridade intracelular, sendo importante para proteger embriões de camundongos contra o estresse osmótico na tuba uterina e controlar o pH intracelular (VAN WINKLE et al., 1990). É encontrada em concentrações elevadas no fluido folicular bovino e quando adicionada ao meio de cultivo de embriões, aumentou de forma significativa o número de blastômeros em relação ao grupo controle (RIEGER; LOSKUTOFF, 1994). Contudo, Silva et al. (2009) observaram que a suplementação de taurina ou glicina no meio de MIV não incrementou o desenvolvimento embrionário, e não exerceu influência direta sobre a maturação oocitária.

### **2.7 Pré-maturação *in vitro* de oócitos bovinos com bloqueadores meióticos**

Inibidores do reinício da meiose, como a roscovitina e a butirolactona I (BLI), têm sido utilizados com o intuito de aumentar o tempo de maturação citoplasmática *in vitro* e, conseqüentemente, melhorar a capacitação de oócitos bovinos durante a MIV (ADONA et al., 2008). Além disso, o bloqueio meiótico pode ser uma alternativa para o transporte de oócitos, quando o cultivo imediato não é possível ou desejável (GUEMRA et al., 2014).

*In vivo*, o bloqueio meiótico, ao estágio de vesícula germinativa (VG), é mantido pela alta concentração de AMP cíclico (AMPc) produzido principalmente pelas células da granulosa, o qual ao adentrar ao oócito, através das junções GAP, suprime a atividade do fator promotor da maturação (MPF) (LANDIM-ALVARENGA e MAZIERO, 2014). Com a expansão das células do cumulus, após o pico de LH, ocorre o desligamento das junções GAP, o que ocasiona um declínio do AMPc intraocitário, levando à desfosforilação e, conseqüentemente à ativação do MPF (VIGNERON et al., 2003; VIGNERON et al., 2004). Além disso, em paralelo, a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), também conhecida como ERK (quinase regulada por sinal extracelular), também controlada pela alta concentração do AMPc, promove a estabilização do MPF nos oócitos (VIGNERON et al., 2004; LANDIM-ALVARENGA

e MAZIERO, 2014). A ativação da MAPK ocorre com a proximidade do rompimento da VG, com 7-8 horas após o cultivo *in vitro* e apresenta aumento gradual até 12-14 horas de maturação, sugerindo que sua ação não é requerida para o reinício da meiose, mas essencial em eventos pós-rompimento da VG (KUBELKA et al., 2000).

A retomada da meiose *in vitro* ocorre porque o oócito é libertado da influência de fatores de inibição presentes no folículo (KOTSUJI et al., 1994). Dessa forma, os bloqueadores meióticos inseridos no cultivo atuam inibindo seletivamente as quinases, mais especificamente a proteína quinase p34<sup>CDC2</sup>, também conhecida como quinase CDK1, que integra o MPF (KUBELKA et al., 2000; VIGNERON et al., 2004). Portanto, tem sido observado que, apesar de inibir a meiose dos oócitos, a pré-maturação com inibidores de CDK não bloqueiam completamente a maturação, permanecendo ativos os eventos de condensação cromossômica e invaginação do envelope nuclear (KUBELKA et al., 2000; LEAL et al., 2012).

Mermillod et al. (2000) demonstraram que o bloqueio meiótico com 25 µM de roscovitina por 24 horas não diminuiu o potencial de desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, a indução da inibição meiótica utilizando BLI tem-se mostrado eficiente, podendo inibir, reversivelmente, o recomeço da meiose sem prejudicar o desenvolvimento subsequente (LONERGAN et al., 2000; FAIR et al., 2002). Entretanto, o uso de baixas ou altas doses, ainda, é discutido (KUBELKA et al., 2000; LONERGAN et al., 2000; PONDERATO et al., 2001; FAIR et al., 2002; LONERGAN et al., 2003; ADONA et al., 2008; LEAL et al., 2012; GUEMRA et al., 2014). Ponderato et al. (2001) verificam que a combinação de BLI e roscovitina, em baixas doses, foi capaz de bloquear meiose reversivelmente, mantendo uma normal capacidade de desenvolvimento oocitário.

Lonergan et al. (2000) observaram que a utilização de um meio com 100 µM de BLI, durante 24 horas, promoveu a inibição meiótica de mais de 60% dos oócitos, enquanto que 150 µM inibiu a meiose de quase todos os oócitos. Entretanto, oócitos bloqueados com 150 µM exibiram uma capacidade de desenvolvimento embrionário inferior aos grupos controle e tratados com 100 µM de BLI (LEAL et al., 2012).

Adona et al. (2008) constataram que a utilização de 10 µM de BLI em meio livre de BSA propiciou taxas de VG semelhantes à utilização de 100 µM em meio suplementado com BSA, com taxas de 98,7% vs. 97,4%, respectivamente. Contudo, a

utilização de 100  $\mu$ M de BLI reduziu a taxa de blastocisto (33%) em comparação ao grupo pré-maturado com 10  $\mu$ M (41,6%) e ao grupo controle (38,3%).

### 3. Objetivos

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de MIV de oócitos bovinos com diferentes macromoléculas (SFB, BSA ou PVA), concentrações de EGF ou pré-cultivados, antes da MIV, com butirolactona I (BLI) sobre a expressão de genes associados com o desenvolvimento de competência oocitária, quantificando em oócitos transcritos correspondentes a fatores que interagem com células foliculares (GDF9, BMP15 e OOSP1) e, em células do cumulus, genes associados à qualidade do oócito maturado (GREM1), atividade glicolítica (PFKP), síntese de prostaglandinas (PTGS2), formação da matriz extracelular (HAS2, VCAN e PTX3), fatores de crescimento semelhante ao EGF (AREG e EREG) e sua atividade de clivagem (ADAM10 e ADAM17), comparando com oócitos maturados *in vivo* e imaturos. Hipotetizamos que, oócitos e CC de oócitos maturados *in vivo* ou *in vitro*, em meio contendo SFB, EGF ou pré-incubados com BLI, apresentarão maior abundância de transcritos para os genes associados com o desenvolvimento de competência oocitária.

### 4. Referências Bibliográficas

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L.

Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Anim Reprod Sci**, v. 108, n. 1-2, p. 49-65, Oct 2008. ISSN 0378-4320 (Print)

ALI, A.; SIRARD, M. A. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the

response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. **Zygote**, v. 10, n. 1, p. 65-71, Feb 2002. ISSN 0967-1994 (Print).

BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. J. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro*

matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Anim Reprod Sci**, v. 98, n. 3-4, p. 282-92, Apr 2007. ISSN 0378-4320 (Print).

BALTAR, A. E.; OLIVEIRA, M. A.; CATANHO, M. T. Bovine cumulus/oocyte complex: quantification of LH/hCG receptors. **Mol Reprod Dev**, v. 55, n. 4, p. 433-7, Apr 2000. ISSN 1040-452X (Print).

BEKER, A. R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1663-73, Dec 2002. ISSN 0093-691X (Print).

BARNES, F.L.; FIRST, N.L. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 29, p. 117-123, 1991.

BESSA, I. R. et al. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. **Reprod Dom Anim**, v. 48, n. 5, p. 781-9, Oct 2013. ISSN 1439-0531 (Electronic).

BOATMAN, D.E. Responses of gametes to the oviductal environment. **Hum Reprod**, v.2, p.133-149, 1997.

BUCCIONE R.; SCHROEDER A.; EPPIG J. Interactions between somatics cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol Reprod**, v. 43, p.543-547, 1990.

CALDEIRA, J.O.; CALEGARI, R.S.; SOUZA, D.G.; PASCHOAL, D.M.; SUDANO, J.M.; MARTINS JR, A. Substituição do meio TCM pelo meio BARC, suplementado com SFB, BSA ou PVA, para a maturação de oócitos bovinos in vitro, não incrementa a subsequente produção de blastocistos. **Vet Zootec**, no prelo 2014.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SILVESTRE, M.A.; RUIZ, R.; RATH, D. Effect of sex-sorted sperm on development and quality of in vitro-produced bovine embryos derived from ovum pick up oocytes **Anim Sci Pap Rep**, v.31, n.2, p.111-122, 2013.

CETICA, P. D. et al. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. **IUBMB Life**, v. 51, n. 1, p. 57-64, Jan 2001. ISSN 1521-6543 (Print).

CHA, K.Y.; CHIAN, R.C. Maturation *in vitro* of immature human oocyte for clinical use. **Hum Reprod Update**, v.4, p. 103-120, 1998.

CHABEREK, S.; MARTELL, A. E. **Organic sequestering agents; a discussion of the chemical behavior and applications of metal chelate compounds in aqueous systems**. New York: Wiley, 1959. 616 p.

CÓRDOVA, B.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, T.; MOGAS, T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepuberal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.74, p. 1341-1348, 2010.

CRITSER, E.S.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L. & FIRST, N.L. A Acquisition of development competence during maturation in vitro. **Theriogenology**, v. 25, p.150, 1986.

COELHO, L. A.; ESPER, C.R.; ALVAREZ, R.H.; VANTINI, R.; ALMEIDA JUNIOR, I.L. Produção In Vitro de Embriões Bovinos: Utilização de Diferentes Fontes de Gonadotrofinas na Maturação dos Oócitos. **Rev Bras Zootec**, v.31, n.3, p.1117-1121, 2002.

DE MATOS, D.G., FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, p.761-771, 2000.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol Reprod**, v. 57, n. 6, p. 1420-5, Dec 1997. ISSN 0006-3363 (Print).

DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. **Mol Reprod Dev**, v. 47, p.456-467, 1997.

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK,S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Global genes expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, v.68, p.91-97, 2007.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; MOTLIK, J.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes in vitro using butyrolactone I: effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. **Mol Reprod Dev**, v. 62, n. 3, p. 375-86, Jul 2002. ISSN 1040-452X (Print)

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.172-181, 2008.

FERRO, A.C.; SILVA, C.; CALEGARI, R.S.; CRESPILO, A.M.; MARTINS Jr., A. Produção de embriões *in vitro* em meio de cultura com ácido ascórbico. **Vet. Zootec.**, v.16, p.80-88, 2009.

FURNUS, C.C.; MATOS, D.G.; PICCO, S.; GARCÍA, P.P.; INDA, A.M.; MATTIOLI, G.; ERRECALDE, A.L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 109, p.88-99, 2008.

GANDHI, A.P.; LANE, M.; GARDNER, D.K.; KRISHER, R.L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Hum Reprod**, v.15, p.395-401, 2000.

GARDNER, D.K. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell Biol**, v.18, p.1163-1179, 1994.

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI, PALO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology.**, v.54, p.1537-1542, 2000.

GEORGE, E.L.; GEORGES-LABOUESSE, E.N.; PATEL-KING, R.S.; RAYBURN, H.; HYNES, R.O.; Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. **Development**, v.119, p.1079-1091, 1993.

GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTEBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. Enhanced survivability of cloned derived from roscovitine-treated adult somatics cells. **Biol Reprod**, v.66, p.895-900, 2002.

GILCHRIST, R.B.; ALBUZ, F.K.; THOMPSON, J.G. A new approach to *in vitro* maturation (IVM) and embryo *in vitro* production: induced IVM substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Reprod Fertil Dev**, v.22, p.293, 2010.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.431-446, 2004.

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.

GLIEDT, D.W.; ROSENKRANS Jr., C.F.; RORIE, R.W.; MUNYON, A.L.; PIERSON, J.N.; MILLER, G.F.; RAKES, J.M. Effects of media, serum, oviductal cells,

and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. **J Dairy Sci**, v. 79, p. 536-542, 1996.

GRAY C.W.; MORGAN P.M.; KANE M.T. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. **J Reprod Fertil**, v. 94, p. 471-480, 1992.

GUEMRA, S.; DA SILVA SANTO, E.; ZANIN, R.; MONZANI, P. S.; SOVERNIGO, T. C.; OHASHI, O. M.; VERDE LEAL, C. L.; ADONA, P. R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982-7, Apr 15 2014. ISSN 1879-3231 (Electronic)

GUERIN, P.; MÉNÉZO, Y. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. **Zygote**, v.3, p.333-343, 1995.

HUXTABLE, R.J. Physiological actions of taurine. **Physiol Rev**, v.72, p.101-163, 1992.

GONÇALVES PBD, BARRETA MH, SANDRI LR, FERREIRA R, ANTONIAZZI AQ. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.212-217, 2007.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim.**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

HERRLER, A.; LUCAS-HAHN, I.A.; NIEMANN, H. Effects of insulin-like growth factor-I on *in-vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p. 1213-1224, 1992.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol**, v. 296, n. 2, p. 514-21, Aug 15 2006. ISSN 0012-1606 (Print).

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. . **Reprod Fertil Suppl**, v.38, p.35-47, 1989.

KANE, M.T. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion *in vitro*. **J Reprod Fertil**, 1985;73:147-150.

KESKINTEPE, L.; BURNELEY, C.A.; BRACKETT, B.G. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. **Biol Reprod**, v. 52, p. 1410-1417, 1995.

KIM, K.; MITSUMIZO, N.; FUJITA, K.; UTSUMI, K. The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 787-99, Mar 1996. ISSN 0093-691X (Print).

KOR, N. M.; KHANGHAH, K. M.; VEISI, A. Follicular fluid concentrations of biochemical metabolites and trace minerals in relation to ovarian follicle size in dairy cows. **Annu Rev Res Biol**, v. 3, n. 4. p. 397-404, 2013.

KORKONE, K; KANANEN, K; KETOJA, E; MATOMA, J; HALMEKYTO, M; PEIPPO, J. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. **Reprod Domest Anim**, v.45, p.42-49, 2010.

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.49, p.103-114, 1998.

KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. **J Reprod Fertil**, v. 100, n. 1, p. 151-6, Jan 1994. ISSN 0022-4251 (Print)

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R. M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v. 62, n. 2, p. 292-302, Feb 2000. ISSN 0006-3363 (Print)

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

LEAL, C.L.; MAMO, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Gene expression in bovine oocytes and cumulus cells after meiotic inhibition with the cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone I. **Reprod Dom Anim**, v.47, p.615-624, 2012. ISSN 1439-0531 (Electronic)

LEE, E. S.; FUKUI, Y. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by vitro-produced bovine morulae and blastocysts. **Biol Reprod**, v. 55, n. 6, p. 1383-9, Dec 1996. ISSN 0006-3363 (Print).

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined conditions. **Reprod Nutr Dev**, v. 34, p. 329-339, 1994.

LONERGAN P., CAROLAN C., VAN LANGENDONCKT A., DONNAY I. KHATIR H. & MERMILLOD P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biol Reprod**, v.54 p.1420-1429, 1996.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Mol Reprod Dev**, v. 57, n. 2, p. 204-09, Oct 2000.

LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P. M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. **Mol Reprod Dev**, v. 64, n. 3, p. 369-78, Mar 2003. ISSN 1040-452X (Print), n. 2, p. 204-9, Oct 2000. ISSN 1040-452X (Print).

LORENZO, P. L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, J.C.; ILLERA, M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. **J Reprod Fertil**, v. 101, n. 3, p. 697-701, Aug 1994. ISSN 0022-4251 (Print).

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009.

MARTINS Jr., A.; BRACKETT, B.G. Bovine blastocyst development in chemically defined media after *in vitro* maturation with low concentration of recombinant human FSH. **Rev Bras Reprod Anim**, v.27, p.398-400, 2003.

MARTINS Jr., A.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Use of recombinant gonadotrophins for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v.49, p.292, 1998.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Effects of supplementation of the maturation media with insulin on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Jpn J Vet Res**, v. 43, p. 145-153, 1995.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in

culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Mol Reprod Dev**, v. 55, n. 1, p. 89-95, Jan 2000. ISSN 1040-452X (Print)

MERTON, J. S.; Knijn, H. M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B.A.J.; VOS, P.L.A.K; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 365-71, Sep 1 2013. ISSN 1879-3231 (Electronic).

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA E SILVA, A.A.M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. **Anim Reprod Sci**, v.69, p.175-186, 2002.

ORSI, N. M.; GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H.J.; PICTON, H.M.; HARRIS, S.E. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 219-28, Feb 2005. ISSN 1470-1626 (Print).

PASCHOAL, D.M.; CALEGARI, R.S.; MARTINS Jr., A. Development of bovine embryos by using penicilline -containing culture medium. **Biol Reprod**, v. p.126-127, 2006.

PEREIRA, M.M.; COSTA, F.Q.; OLIVEIRA, A.P.; SERAPIÃO, R.V.; MACHADO, M.A.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO L.S.A. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, p.1394-1400, 2010.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**, v.41, p.1241-1249, 1994.

PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. **Mol Reprod Dev**, v. 60, n. 4, p. 579-85, Dec 2001. ISSN 1040-452X (Print).

RAHIM, B.; JALAL, S.; YOSEF, N. Effect of cysteine supplementation on *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Afr J Biotechnol**, v.10, p.15830-15833, 2011.

REVELLI, A.; DELLE PIANE, I.; SIMONE, C.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical

markers to metabolomics. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, p. 40, 2009. ISSN 1477-7827 (Electronic).

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. M. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. **J Reprod Fertil**, v. 100, n. 1, p. 257-62, Jan 1994. ISSN 0022-4251 (Print).

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

ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL, G. E., JR. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. **Biol Reprod**, v. 55, n. 5, p. 1012-6, Nov 1996. ISSN 0006-3363 (Print).

ROY, B.; RAJPUT, S.; RAGHAV, S.; KUMAR, P.; VERMA, A; JAIN, A.; JAIN, T.; SINGH, D.; DE, S.; GOSWAMI, S.L.; DATTA, T.K. (2013). Characterization of oocyte-expressed GDF9 gene in buffalo and mapping of its TSS and putative regulatory elements. **Zygote**, v.21, p.115-124, 2013.

SILVA, C.; CALEGARI, R.S.; MARTINS Jr., A. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação *in vitro* de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. **Vet Zootec**, v.16, p.89-100, 2009.

SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na função ovariana e desenvolvimento embrionário. **Acta Vet Bras**, v.4, n.4, p.215-226, 2010.

SUTTON, M.L.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; KIND, K.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v.126, p.27-34, 2003.

SURRESH, K.P.; NANDI, S.; MONDAL, S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. **Theriogenology**, v. 72, p. 978-85, 2009.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence

on oocyte developmental capacity. **Hum Reprod Update**, v. 9, n. 1, p. 35-48, Jan-Feb 2003. ISSN 1355-4786 (Print)

TERVIT, H. R.; WHITTINGHAM, D. G.; ROWSON, L. E. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **J Reprod Fertil**, v. 30, n. 3, p. 493-7, Sep 1972. ISSN 0022-4251 (Print)

TRIMBRELL, J.A.; SEABRA, V.; WATERFIELD, C.J. The *in vivo* and *in vitro* protective properties of taurine. **Gen Pharmacol**, v.26, p.453-462, 1995.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim Reprod Sci**, v. 61, p. 263-265, 2000.

VAN WINKLE, L.J.; HAGHIGHAT, N.; CAMPIONE, A.L. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the organic ions in oviductal fluid. **J Exp Zool**, v.253, p.215-219, 1990.

VIGNERON, C.; NUTTINCK, F.; PERREAU, C.; REINAUD, P.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P. Effect of roscovitine, a cdk1 inhibitor, and of the presence of oocyte on bovine cumulus cell expansion and cyclooxygenase-2 expression. **Mol Reprod Dev**, v. 65, n. 1, p. 114-21, May 2003. ISSN 1040-452X (Print)

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DALBIES-TRAN, R.; JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; UZBEKOVA, S.; MERMILLOD, P. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. **Mol Reprod Dev**, v. 69, n. 4, p. 457-65, Dec 2004. ISSN 1040-452X (Print)

XU, K.P.; BRACKET, B.G. A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **J Reprod Fertil**, v.82, p.127-134, 1988.

YURTTAS, P.; MORENCY, E.; COONROD, S.A. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. **Reproduction**, v.139, p.809-823, 2010.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, D.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, p. 2105-2117, 2002.

WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on

oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biol Reprod**, v. 62, n. 2, p. 355-64, Feb 2000. ISSN 0006-3363 (Print).

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS JR, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum Reprod.**, v.16, p.893-901, 2001.

ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; NASR-ESFAHANI, M. H.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; ZARE-SHAHNEH, A. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. **J Assist Reprod Genet**, v. 26, n. 11-12, p. 605-11, Nov-Dec 2009. ISSN 1573-7330 (Electronic).

ZHANG, K.; EALY, A. Supplementing fibroblast growth factor 2 during bovine oocyte *in vitro* maturation promotes subsequent embryonic development. **Open J Anim Sci**, v.2, p.119-126, 2012.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 815-26, Dec 2010. ISSN 1741-7899 (Electronic).

## CAPÍTULO I

### **Quantificação de mRNA em oócitos e células do cumulus de oócitos imaturos, cultivados *in vivo* ou em meio de maturação *in vitro* suplementado com diferentes macromoléculas.**

Este artigo será submetido ao periódico Animal Reproduction Science e encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas. Contudo, está sendo utilizada a língua portuguesa e as figuras estão entre os parágrafos dos resultados apenas para facilitar a leitura e discussão da tese.

**Título:** Quantificação de mRNA em oócitos e células do cumulus de oócitos imaturos, cultivados *in vivo* ou em meio de maturação *in vitro* suplementado com diferentes macromoléculas.

**Autores:** Diego Gouvêa de Souza<sup>1</sup>, Fernanda Nunes Marqui<sup>1</sup>, Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli<sup>2</sup>, Andressa Vilas Boas Nogueira<sup>2</sup>, Alicio Martins Jr.<sup>3</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>.

**Filiações:** 1 – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil. 2 – Diagnóstico e Cirurgia – FOAR, UNESP, Araraquara, Brasil. 3 - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – FMVA, UNESP, Araçatuba, Brasil.

**Resumo:**

Quando meios quimicamente definidos são utilizados, SFB e BSA têm sido substituídos por macromoléculas sintéticas, como o álcool polivinílico (PVA). Contudo, a taxa de formação de blastocistos viáveis é menor. Este estudo teve como objetivo quantificar os transcritos dos genes GDF9, BMP15 e OOSP1 em oócitos e GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 e ADAM17 nas células do cumulus (CC), a partir de oócitos imaturos (estado de VG), maturados *in vivo* (MIVO) ou cultivados em meio de maturação *in vitro* (MIV) suplementado com 10% de SFB, 4 mg/mL de BSA ou 1 mg/mL de PVA. Para a MIVO, 10 doadoras foram submetidas à superovulação com FSH e os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) obtidos através de “OPU”, 19-20 h após aplicação de gonadorelina. A quantidade relativa de transcritos para o gene GREM1, PTGS2, PFKP e AREG foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC de oócitos MIVO do que em VG ou com MIV. Células do cumulus de oócitos cultivados

em meio de MIV, contendo SFB, exibiram maior quantidade de transcritos para o gene ADAM10 do que aquelas MIVO. CCO cultivados em meio de MIV, contendo PVA, exibiram menor abundância ( $P < 0,05$ ) de PTGS2 do que aqueles MIVO, com quantificação similar àquelas encontradas nas CC de oócitos em VG. Maior transcrição ( $P < 0,05$ ) de GREM1 e AREG foi observada nas CC de oócitos cultivados em meio de MIV com SFB. Assim, conclui-se que, a adição de SFB no meio de MIV influenciou positivamente a transcrição gênica em GREM1 e AREG quando comparada com BSA e PVA. Porém, a maior expressão nas CC de oócitos MIVO indica a necessidade de pesquisas voltadas para o estabelecimento de meios e/ou condições de MIV mais eficientes para melhorar a competência oocitária.

**Palavras chave:** Expressão gênica, competência oocitária, MIV, SFB, BSA, PVA.

## 1. Introdução

A falta de indicadores confiáveis sobre a competência para o desenvolvimento do oócito, bem como a baixa taxa de sucesso de maturação *in vitro* (MIV) ainda são obstáculos para a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos.

Em condições *in vivo*, a maturação oocitária é um processo induzido, através do qual o aprisionamento meiótico, mediado pelo AMPc, é sobrepujado pela onda de gonadotrofina antes da ovulação (Gilchrist et al., 2010). Em comparação com os oócitos maturados *in vivo*, os quais ainda estão em processo de adquirir competência para desenvolvimento, oócitos maturados *in vitro* sofrem maturação prematura, sendo que a cascata molecular que reinicia a meiose difere, inteiramente, daquela que ocorre *in vivo* (Gilchrist e Thompson, 2007). Assim, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir

plena capacitação e, desta forma, o desenvolvimento *in vitro* de oócitos bovinos para o estágio de blastocisto é limitada a cerca de 30 a 40% (Rizos et al., 2002).

A aquisição de competência pelos oócitos é afetada por fatores endócrinos, parácrino e autócrino, ocorrendo durante a ovogênese e desenvolvimento folicular, sendo de importância nos sistemas de cultivo (Li et al., 2008). A MIV está limitada intrinsecamente ao desenvolvimento do oócito, implicando em alterações moleculares e bioquímicas que permitem ao oócito maturado ser fertilizado normalmente e se tornar um embrião (Gilchrist e Thompson, 2007). Durante esta fase as mitocôndrias sintetizam ATP necessário para a síntese protéica durante a maturação e, posterior, desenvolvimento embrionário (Krisher e Bavister, 1998). A transcrição e estocagem de grande quantidade de material nos oócitos não possuem papel seletivo na oogênese, mas são importantes para a regulação da embriogênese (Yurttas et al., 2010), da mesma forma que a ativação da transcrição do genoma embrionário é requerida para o desenvolvimento além do estágio de transição materno-zigoto (Barnes e First, 1991).

As células do cumulus fornecem ao oócito nutrientes e sinais regulatórios que facilitam a progressão da maturação, especialmente, da maturação nuclear. Entretanto, fatores secretados pelo oócito permitem a diferenciação das células do cumulus, a partir das células murais da granulosa, além de sua mucificação (Gilchrist et al., 2004). Diversos genes críticos para o desenvolvimento do oócito são expressos nas células do cumulus e estão sob o controle de sinais maternos e do oócito, sendo representativa do estágio de maturação (Gebhardt et al., 2011a).

A remoção completa do soro em protocolos de cultivo tem sido um desafio (Watson et al., 2000). As fontes protéicas mais utilizadas como suplemento em meios para a PIV de embriões bovinos são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) (Mingoti et al., 2002), porém, as fontes de origem animal podem carrear

agentes infecciosos e tóxicos para o embrião (Gardner, 1994), além de possuírem compostos indefinidos, os quais, quando utilizados no cultivo embrionário, alteram a abundância relativa de transcritos (Rizos et al., 2002). Porém, quando meios quimicamente definidos são utilizados (Keskinetepe et al., 1995), SFB e BSA têm sido substituídos por macromoléculas sintéticas, álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP). Contudo, a utilização de meios quimicamente definidos produz taxas de formação de blastocistos viáveis mais baixas (Korhonen et al., 2010).

Este estudo tem como objetivo quantificar transcritos com grande potencial de marcação de competência em oócitos (BMP15, GDF9 e OOSP1) e em células do cumulus (GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 e ADAM17), a partir de oócitos imaturos, maturados *in vivo* ou cultivados em meio de MIV com diferentes macromoléculas (SFB, BSA ou PVA). Hipotetizamos que, oócitos e CC de oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, em meio contendo SFB, apresentarão maior abundância de transcritos para genes marcadores de competência oocitária do que oócitos imaturos.

## **2. Material e Métodos**

A menos que especificado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

### *2.1 Grupos experimentais*

Cinco grupos de tratamento foram delineados, a saber: oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG), oócitos cultivados em meio de MIV com 10% de SFB (SFB), oócitos cultivados em meio de MIV com 4 mg/mL de BSA (BSA), oócitos

cultivados em meio MIV com 1 mg/mL de PVA (PVA) e oócitos maturados *in vivo* (MIVO).

## 2.2. *Maturação in vitro*

Ovários de vacas foram colhidos de animais abatidos em frigorífico, no máximo 30 minutos *post-mortem*. O transporte foi feito em garrafa térmica contendo solução fisiológica à temperatura de 31 a 33° C. Folículos de 2-7 mm de diâmetro foram puncionados utilizando agulha calibre 18 G e seringa de 10 mL. O líquido folicular foi colocado em tubo de centrífuga de 15 mL e mantido a 37° C para sedimentação dos complexos cumulus oócito (CCO).

A seguir, os CCO com citoplasma homogêneo e pelo menos 3 a 4 camadas de células do cumulus foram lavados três vezes e selecionados em meio PBS com 10% de SFB (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, Brasil). Após a seleção, grupos de 25 oócitos foram transferidos para gotas de 100 µL de meio MIV, dispersas em placa de Petri (60 x 10 mm), sob óleo mineral. O meio de maturação foi constituído de meio 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 1 µg/mL de FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Inc, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canadá), 1 µg/mL de Estradiol (Sigma Co., St. Louis, EUA), 0,10 mM de Cisteamina (Sigma Co., St. Louis, EUA) e 10% de SFB, 4 mg/mL de BSA ou 1 mg/mL de PVA. A MIV foi conduzida em estufa de cultivo (Forma Scientific, USA), em atmosfera úmida, a 5% CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,8° C, por 24 horas.

### 2.3 *Maturação in vivo (MIVO)*

Os CCO maturados *in vivo* foram obtidos através de “OPU” a partir de 10 doadoras da raça Nelore, previamente, sincronizadas (D0) com dispositivo intravaginal de progesterona (Primer<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, Brasil). Nos dias 4, 5 e 6 os animais receberam 180 mg de FSH, em seis doses decrescentes, sendo que no D6 foi administrado 0,53 mg de cloprostenol sódico (Ciosin<sup>®</sup>, MSD, Brasil). No D7, o dispositivo intravaginal foi removido e a “OPU” realizada 19 a 20 horas após a aplicação de 2,5 mg de gonadorelina (Fertagyl<sup>®</sup>, Intervet, Brasil). Os CCO com citoplasma homogêneo e células do cumulus expandidas foram armazenados à - 80° C para posterior análise da expressão gênica.

### 2.4 *Análise da expressão gênica*

As células do cumulus foram removidas através de sucessivas pipetagens, em meio PBS com 0,1% de hialuronidase. As gotas contendo somente as CC foram centrifugadas (3.355 x g/10 min) para formação de sedimento e, então, oócitos desnudos e o sedimento das células do cumulus foram congelados, separadamente, em 350 µL de meio para extração de RNA total, sendo armazenados a - 80° C para posterior análise da expressão gênica.

A extração de RNA foi realizada pelo “RNeasy Micro kit” (Qiagen - Hilden, Alemanha) e quantificada em espectrofotômetro de microvolumes (“NanoVue, GE Healthcare”), considerando a relação A260/A280 entre 1.8 e 2.1 como indicativa da pureza do RNA obtido. Após a purificação, as amostras de RNA foram eluídas em 30 µL de água livre de RNase. O cDNA foi sintetizado com a utilização do kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)”, de acordo com as instruções do fabricante. O RT-PCR foi realizado com reagentes “SYBR<sup>®</sup> Green PCR

Master Mix (Applied Biosystems)”; as reações foram realizadas com volume final de 20  $\mu$ L, com amplificação dos genes a 95° C/10 min, desnaturação a 95° C/15 s, seguido de anelamento por 1 min (40 ciclos). As sequências dos “primers”, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene são apresentados na Tabela 1.

Os dados de transcritos dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH. Esta reação foi feita em termocicladora “StepOne (Applied Biosystems)” e os resultados analisados através do método  $\Delta$  ( $\Delta$ Ct), empregando o “software” da própria termocicladora para quantificação relativa da expressão dos genes alvo, após normalização para o gene constitutivo.

**QUADRO 1** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, estrutura celular analisada, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento

Genes	Sequência	Estrutura analisada	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de Anelamento (° C)
GAPDH	F 5'- GCGTGAACCACGAGAAGTATAA -3' R 5'- CCCTCCACGATGCCAAAGT -3'	Oócito/Cumulus	119	62
GDF9	F 5'- TGGTCCTTGCTGAAGCATCTAGA -3' R 5'- ACAGTGTGTAGAGGTGGCTTCT -3'	Oócito	202	59
BMP15	F 5'- GTCAGCAGCCAAGAGGTAGTG -3' R 5'- CCCGAGGACATACTCCCTTAC -3'	Oócito	360	59
OOSP1	F 5'- GCCAAGATTAAACCCACACTATTT -3' R 5'- ATAATGAGCATCTGGTGAAACGTA -3'	Oócito	182	56
GREM1	F 5'- GTCACACTCAACTGCCCTGA -3' R 5'- GCACACGAACTACGCACAAG -3'	Cumulus	251	57
PTGS2	F 5'- AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA -3' R 5'- TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT -3'	Cumulus	168	60
PFKP	F 5'- TCAGAGAACCGTGCCTGGAAGAAA -3' R 5'- TGACCACAAGCTCCTTGATCTGCT -3'	Cumulus	112	59
AREG	F 5'- CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT -3' R 5'- CGTTCTTCAGCGACACCTTCA -3'	Cumulus	100	60
EREG	F 5'- ACTGCACAGCATTAGTTCAAACTGA -3' R 5'- TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT -3'	Cumulus	100	60
HAS2	F 5'- ACACAGACAGGCTGAGGACAACCT -3' R 5'- AAGCAGCTGTGATTCCAAGGAGGA -3'	Cumulus	133	60
VCAN	F 5'- GCACCTGTGTGCCAGGATA -3' R 5'- CAGGGATTAGAGTGACATTCATCA -3'	Cumulus	70	60
PTX3	F 5'- CCTCAGCTATCGGTCCATAA -3' R 5'- ATTGAAGCCTGTGAGGTCTGC -3'	Cumulus	294	54
ADAM10	F 5'- ACCCCCAAAGTCTCTCACA -3' R 5'- AATCATGCGGAGATCCAAAGTT -3'	Cumulus	210	60
ADAM17	F 5'- TGGGATGTGAAGATGTTGCTAGA -3' R 5'- ATCCAAGTGTCCCATATCAAAATC -3'	Cumulus	105	60

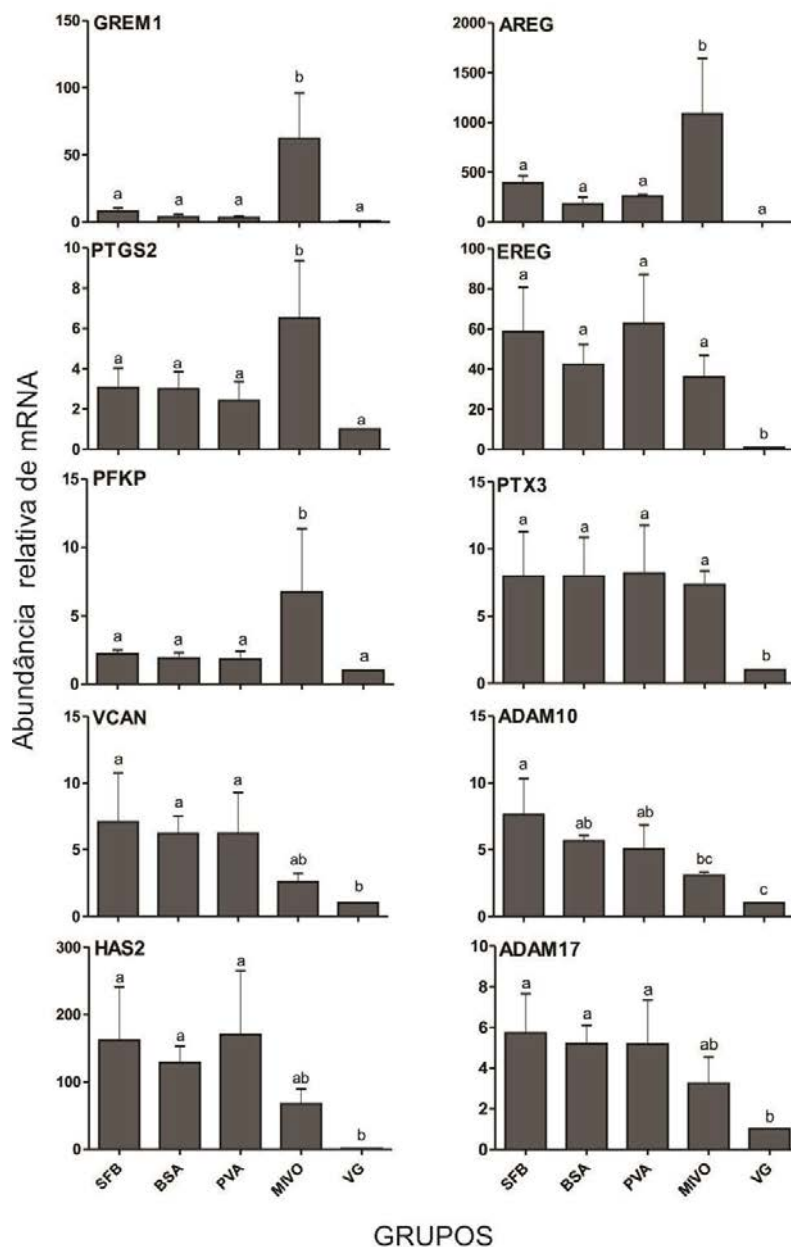
### 2.5 Análise estatística

Os dados relativos à expressão gênica de oócitos e células do cumulus foram analisados através de ANOVA, sendo a diferença entre as médias determinada pelo teste de Tukey e  $P < 0,05$  considerado como significativo. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3. Resultados

3.1 Comparação entre a expressão gênica nas células do cumulus de oócitos imaturos, maturados *in vitro*, em meio com diferentes macromoléculas, e oócitos maturados *in vivo*, seguido de OPU.

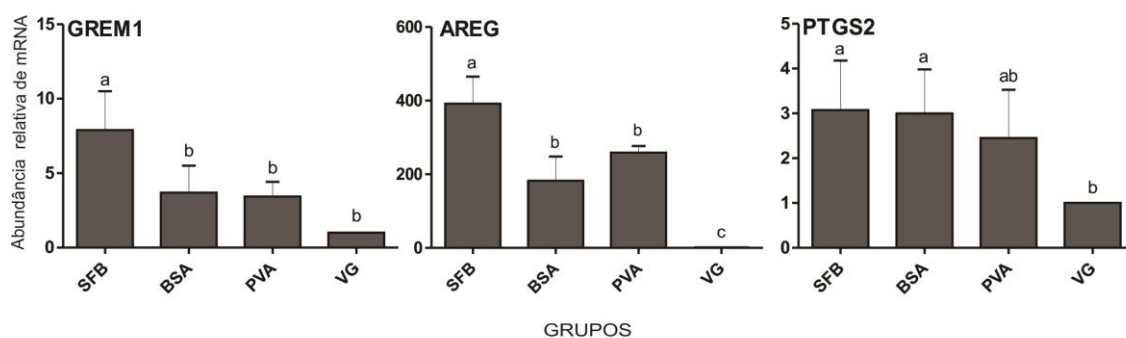
Os resultados da expressão gênica de GREM1, PTGS2, PFKP, VCAN, HAS2, AREG, EREG, PTX3, ADAM10, ADAM17 nas células do cumulus encontram-se descritos na Figura 1. A abundância relativa de mRNA de GREM1 e AREG, PTGS2 e PFKP foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC de oócitos maturados *in vivo* do que nos oócitos imaturos ou maturados *in vitro*. Oócitos maturados *in vivo* exibiram transcrição de VCAN, HAS2, ADAM10 e ADAM17, nas CC, similares aos oócitos imaturos, com oócitos maturados *in vitro* produzindo mais ( $P < 0,05$ ) transcritos, desses genes, em comparação com CC de oócitos imaturos. Entretanto, CC de oócitos maturados em meio contendo SFB exibiram maior ( $P < 0,05$ ) quantidade relativa de transcritos de ADAM10 do que no grupo maturado *in vivo*. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos maturados *in vitro* e o grupo maturado *in vivo* para os genes VCAN, HAS2, EREG, PTX3 e ADAM17. Diferença ( $P < 0,05$ ) foi observada nas CC de oócitos maturados *in vitro* para a abundância de transcritos de VCAN, HAS2, EREG, PTX3, ADAM10, ADAM17, do que nas CC de oócitos imaturos, sendo que EREG e PTX3 foram, também, expressos em maior quantidade nas CC de oócitos maturados *in vivo*, em comparação com CC de oócitos imaturos ( $P < 0,05$ ).



**Figura 1** – Comparação da abundância de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo SFB, BSA ou PVA, oócitos maturados *in vivo* (MIVO) e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

Entre os grupos cultivados *in vitro* foi constatado maior abundância relativa de mRNA de GREM1 e AREG ( $P < 0,05$ ) nas CC de oócitos cultivados em meio de MIV com SFB (Figura 2). Contudo, não houve diferença entres os grupos maturados *in vitro*

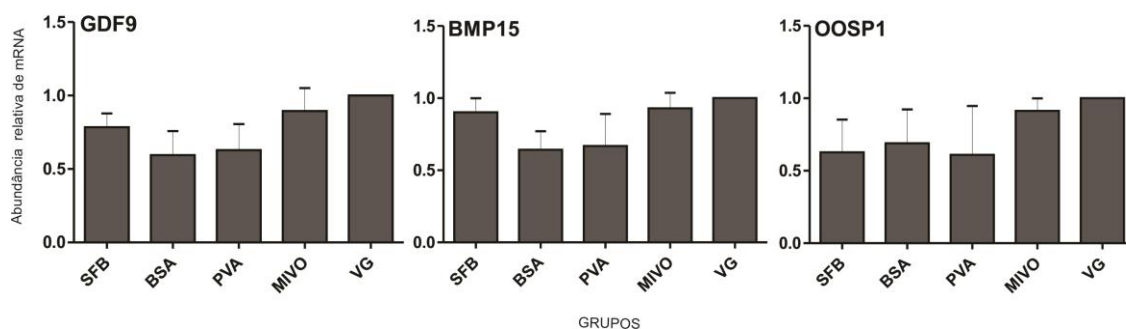
para os genes PFKP, PTGS2, VCAN, HAS2, EREG, PTX3, ADAM10 e ADAM17; por outro lado, exibiram maior número de transcritos nas CC do que oócitos imaturos ( $P < 0,05$ ), com exceção de oócitos cultivados em meio de MIV com PVA para o gene PTGS2 (Figura 2).



**Figura 2** – Comparação entre a abundância de transcritos GREM1, AREG e PTGS2 nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo SFB, BSA ou PVA, e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 Efeito de diferentes macromoléculas sobre a expressão gênica em oócitos

Não houve diferença na expressão gênica de GDF9, BMP15 e OOSP1 entre oócitos maturados *in vitro*, em meios contendo SFB, BSA ou PVA, e oócitos MIVO e VG (Figura 3).



**Figura 3** - Quantidade relativa de transcritos de GDF9, BMP15 e OOSP1 entre oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo SFB, BSA ou PVA, oócitos MIVO e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A MIV é uma etapa crítica no processo de aquisição de competência do oócito para seu posterior desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Assim, o meio de maturação desempenha papel vital no estabelecimento de um ambiente altamente propício para que o oócito adquira condições para ser fertilizado e, conseqüentemente, continuar o desenvolvimento embrionário. Portanto, o estabelecimento de meios de maturação e/ou condições mais eficientes para induzir completa competência oócitaria tem sido essencial para a posterior obtenção de melhores resultados na PIV. Assim, a avaliação da expressão gênica assume importância como ferramenta para analisar a qualidade do oócito frente a diferentes condições *in vitro* ou *in vivo*.

A relação entre a qualidade do oócito e a expressão de GREM1 ainda não está muito clara (Cillo et al., 2007). No entanto, tem sido sugerido que o gene GREM1 pode estar associado com o grau de qualidade do embrião (Pangas et al., 2004; McKenzie et al., 2004; Gebhardt et al., 2011a). O GREM1 é um antagonista da sinalização da proteína morfogênica do osso (BMP), regulada pelo GDF9 (McKenzie et al., 2004). Dados recentes indicam seu envolvimento na via de sinalização intrafolicular de BMP, a qual contribui para a regulação negativa da produção de andrógenos nas células da teca (Cillo et al., 2007). A regulação diferencial de BMP, através de GREM1, pode contribuir simultaneamente para a luteinização das células da granulosa e expansão das CC e, portanto, na maturação final dos oócitos (Pangas et al., 2004). Se assim for, a expressão contínua de GREM1 nas CC pode indicar um oócito maduro e, desta forma, predizer um melhor desenvolvimento do embrião (McKenzie et al., 2004). Portanto, a maior abundância de GREM1 nas CC de oócitos maturados *in vivo* sugere uma regulação apropriada de GDF9 e BMP no processo de maturação, enquanto que a maior expressão *in vitro* nas CC de oócitos cultivados em meio MIV com SFB pode indicar

um efeito direto e/ou interação de fatores introduzidos no meio através do soro, os quais poderiam ter influência benéfica sobre a competência oócitaria. Velho et al. (2013) constataram que a utilização de SFB no meio de MIV aumentou a abundância de transcritos nas CC, contudo não interferiu na maturação nuclear do oócito.

A AREG e EREG são membros da família de fatores de crescimento semelhante ao EGF (Romero e Smitz, 2009; Prochazka et al., 2011), sendo considerados como reguladores chave da ovulação e expansão das CC (Romero e Smitz, 2009). No presente estudo, foi observado maior transcrição de AREG nas CC dos oócitos maturados *in vivo*. A expressão desse gene pode desencadear mudanças que sinalizam a retomada da meiose (Conti et al., 2006), além de influenciar efetivamente a qualidade do oócito (Zamah et al., 2010). O SFB adicionado ao meio de MIV foi capaz de aumentar a abundância de AREG, quando comparado com BSA e PVA. Entretanto, nada consta na literatura em relação à influência do SFB no meio de MIV sobre a transcrição de AREG e GREM1 nas CC, embora Córdova et. al. (2011) e Velho et al. (2013) tenham observado que, de modo geral, a suplementação do meio de MIV com SFB proporciona uma maior transcrição de diversos genes nas CC em comparação com o PVA ou BSA .

As CC dos oócitos maturados *in vivo* apresentaram maior abundância relativa de PTGS2 e PFKP do que oócitos imaturos e oócitos maturados *in vitro*. Córdova et. al (2011), observaram maior abundância de PTGS2 nas CC de oócitos maturados em meio contendo SFB do que em meio com PVA. No presente estudo, as CC de oócitos maturados em meio contendo PVA exibiram quantificação similar de PTGS2 para os oócitos imaturos, indicando uma condição de maturação inferior àquela proporcionada pelo SFB e BSA, isto é, provavelmente, devido à ausência de componentes que possam interagir com as células, exibindo, assim, a função de propriedade surfactante, a qual previne adesão do CCO às superfícies plásticas, de vidro e, entre os mesmos. O gene

PTGS2 codifica a enzima COX2, a qual está envolvida na síntese de prostaglandinas; sua expressão nas CC está relacionada com o tempo de maturação e a qualidade dos oócitos (Gebhardt et al., 2011b). A prostaglandina E possui efeitos similares ao LH nas CC, atuando na ativação das células da granulosa e no processo de ovulação, ao induzir a síntese de fatores de crescimento da família do EGF, via AMPc/PKA e MAPK (Nuttinck et al., 2011). O PFKP está relacionado à atividade glicolítica nas CC (Sugiura et al., 2007; Gebhardt et al., 2011b). A interação metabólica entre as CC e oócito é necessária para a produção de energia a partir das células da granulosa (Sugiura et al., 2005). O LH promove o aumento da atividade glicolítica nas CC em oócitos bovinos, mas não nas CC que foram previamente removidas do oócito, sugerindo que fatores secretados pelo oócitos regulam a glicólise nas CC após o aumento do LH (Sugiura et al., 2007).

De modo geral, CC de oócitos maturados *in vitro* apresentaram maior quantidade relativa de transcritos para os genes GREM1, PTGS2, PFKP, VCAN, AREG, EREG, HAS2, PTX3, ADAM10 e ADAM17, sendo que GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG e PTX3 foram mais expressados nas CC de oócitos maturados *in vivo*, quando comparados com a expressão nas CC de oócitos imaturos, indicando um papel importante dos mesmos no processo de maturação *in vitro* e *in vivo*. Contudo, as CC de oócitos maturados *in vivo* exibiram expressão gênica similar para VCAN, HAS2, ADAM10 e ADAM17 em comparação com oócitos imaturos e uma menor expressão do gene ADAM10 do que nas CC de oócitos maturados *in vitro*, em meio de MIV com SFB, podendo ser decorrente da condição natural no folículo, por uma influência da superovulação, devido ao tempo de recuperação do oócito, após a aplicação do GNRH. Os genes VCAN, HAS2 e PTX3 têm sido relacionados com a formação da matriz extracelular e desenvolvimento da competência oócitaria (Salustri et al., 2004;

Adriaenssens et al., 2011). A ADAM10 emergiu como a principal protease de EGF e betacelulina, e a ADAM17 para o EREG, TGF $\alpha$ , AREG e do fator de crescimento semelhante ao EGF, ligado à heparina (Sahin et al., 2004). Muitas dessas ações são fundamentais para a ação do LH, incluindo a expansão do cumulus, maturação oocitária e ovulação (Li et al., 2009).

O GDF9, BMP15 e OOSP1 são fatores secretados pelo oócito, tendo papel essencial no desenvolvimento da foliculogênese, ovulação, fertilização e desenvolvimento do embrião (Caixeta et al., 2009). Não foi observada, neste trabalho, diferença significativa para a quantidade de transcritos dos genes GDF9, BMP15 e OOSP1 nas CC entre os oócitos imaturos e maturados *in vitro* ou *in vivo*. Li et al. (2008a) e Kathirvel et al. (2013) observaram que, em porcas e búfalas, respectivamente, o gene GDF9 foi expresso em maior quantidade em oócitos imaturos, declinando durante o processo de maturação, diferentemente, do BMP15, o qual aumentou no período de 12-18 horas de maturação, decrescendo em seguida. A maior abundância relativa em oócitos imaturos pode ser atribuída ao fato de que após a retomada a meiose os oócitos estão em estado de cromatina condensada e, conseqüentemente, diminuem a transcrição (Tomek et al., 2002).

A menor transcrição de GREM1, PTGS2, PFKP e AREG nas CC de oócitos maturados *in vitro* sofre influência do ambiente, o qual é menos eficiente em comparação com a maturação *in vivo* (Rizos et al., 2002) *In vitro*, o SFB propiciou maior abundância de transcritos nas CC, provavelmente, devido ao fato de conter diversos componentes, entre eles, fatores de crescimento, tais como o FGF e IGF, os quais possuem grande poder mitogênico em diferentes tipos celulares (Zheng et al., 2006), incluindo as células da granulosa (Lorenzo et al., 1994), além de ser supressor de apoptose (Zhandi et al., 2009) e possuir grande habilidade regulatória sobre o

desenvolvimento folicular e a maturação dos oócitos (Zhang et al., 2010). Assim, conclui-se que, apesar de ser ideal a utilização de meios quimicamente definidos para a padronização da PIV de embriões, a adição de SFB no meio de MIV influenciou positivamente a transcrição dos genes GREM1 e AREG nas CC. Entretanto, a maior abundância de transcritos nas CC de oócitos maturados *in vivo* indica a necessidade de pesquisas voltadas para o estabelecimento de meios e/ou condições de MIV mais eficientes para melhorar a competência oocitária.

### Referências bibliográficas

- Adriaenssens, T., Segers, I., Wathlet, S., Smits, J., 2011. The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. *Journal of assisted reproduction and genetics* 28, 31-40.
- Barnes, F.L., First, N.L., 1991. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. *Molecular reproduction and development* 29, 117-123.
- Caixeta, E.S., Ripamonte, P., Franco, M.M., Junior, J.B., Dode, M.A., 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, fertility, and development* 21, 655-664.
- Cillo, F., Brevini, T.A., Antonini, S., Paffoni, A., Ragni, G., Gandolfi, F., 2007. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 134, 645-650.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y., Su, Y.Q., 2006. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715-723.
- Cordova, B., Morato, R., de Frutos, C., Bermejo-Alvarez, P., Paramio, T., Gutierrez-Adan, A., Mogas, T., 2011. Effect of leptin during *in vitro* maturation of prepubertal calf oocytes: embryonic development and relative mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. *Theriogenology* 76, 1706-1715.
- Gardner, D.K., 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell biology international* 18, 1163-1179.
- Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russel, D.L., 2011a. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and Sterility* 96, 42-52.
- Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russell, D.L., 2011b. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and sterility* 96, 47-52 e42.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T., 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal reproduction science* 82-83, 431-446.
- Gilchrist, R.B.; Albuz, F.K.; Thompson, J.G., 2010. A new approach to *in vitro* maturation (IVM) and embryo *in vitro* production: induced IVM substantially

- improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Reproduction, Fertility and Development* 22, 293-293.
- Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67, 6-15.
- Kathirvel, M., Soundian, E., Kumanan, V., 2013. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 ( ) and Bone morphogenetic factor15 ( ) mRNA transcripts during maturation of buffalo ( ) cumulus-oocyte complexes. *SpringerPlus* 2, 206.
- Keskintepe, L., Burnley, C.A., Brackett, B.G., 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biology of reproduction* 52, 1410-1417.
- Korhonen, K., Kananen, K., Ketoja, E., Matomaki, J., Halmekyto, M., Peippo, J., 2010. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 45, 42-49.
- Krisher, R.L., Bavister, B.D., 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49, 103-114.
- Li, H.K., Kuo, T.Y., Yang, H.S., Chen, L.R., Li, S.S., Huang, H.W., 2008a. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Animal reproduction science* 103, 312-322.
- Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.J., Smith, G.W., 2009. Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction* 137, 297-307.
- Li, Q., McKenzie, L.J., Matzuk, M.M., 2008b. Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular human reproduction* 14, 673-678.
- Lorenzo, P.L., Illera, M.J., Illera, J.C., Illera, M., 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of reproduction and fertility* 101, 697-701.
- McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., Matzuk, M.M., 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 19, 2869-2874.
- Mingoti, G.Z., Garcia, J.M., Rosa-e-Silva, A.A., 2002. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal reproduction science* 69, 175-186.
- Nuttinck, F., Gall, L., Ruffini, S., Laffont, L., Clement, L., Reinaud, P., Adenot, P., Grimard, B., Charpigny, G., Marquant-Le Guienne, B., 2011. PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. *Biology of reproduction* 84, 1248-1257.
- Pangas, S.A., Jorgez, C.J., Matzuk, M.M., 2004. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *The Journal of biological chemistry* 279, 32281-32286.
- Prochazka, R., Petlach, M., Nagyova, E., Nemcova, L., 2011. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and

- acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction* 141, 425-435.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development* 61, 234-248.
- Romero, S., Smitz, J., 2009. Epiregulin can effectively mature isolated cumulus-oocyte complexes, but fails as a substitute for the hCG/epidermal growth factor stimulus on cultured follicles. *Reproduction* 137, 997-1005.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C.P., 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology* 164, 769-779.
- Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., Doni, A., Bastone, A., Mantovani, G., Beck Peccoz, P., Salvatori, G., Mahoney, D.J., Day, A.J., Siracusa, G., Romani, L., Mantovani, A., 2004. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 131, 1577-1586.
- Sugiura, K., Pendola, F.L., Eppig, J.J., 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental biology* 279, 20-30.
- Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J., 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 134, 2593-2603.
- Tomek, W., Torner, H., Kanitz, W., 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 37, 86-91.
- Velho, F.A.B., Costa, B.G., Alcoba, D.D., Braga, B.L.R., Monroy, N.L.S., Oliveira, A.T.D., Lopes, R.F.F., 2013. Gene Expression and In Vitro Nuclear Maturation in Bovine Cumulus Oocyte Complexes Matured in a Medium Supplemented with Bovine Fetal Serum or Bovine Serum Albumin. *Acta Scientiae Veterinariae* 41, 1156.
- Watson, A.J., De Sousa, P., Caveney, A., Barcroft, L.C., Natale, D., Urquhart, J., Westhusin, M.E., 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of reproduction* 62, 355-364.
- Yurttas, P., Morency, E., Coonrod, S.A., 2010. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction* 139, 809-823.
- Zamah, A.M., Hsieh, M., Chen, J., Vigne, J.L., Rosen, M.P., Cedars, M.I., Conti, M., 2010. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 25, 2569-2578.
- Zhandi, M., Towhidi, A., Nasr-Esfahani, M.H., Eftekhari-Yazdi, P., Zare-Shahneh, A., 2009. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. *Journal of assisted reproduction and genetics* 26, 605-611.

- Zhang, K., Hansen, P.J., Ealy, A.D., 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction* 140, 815-826.
- Zheng, X., Baker, H., Hancock, W.S., Fawaz, F., McCaman, M., Pungor, E., Jr., 2006. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology progress* 22, 1294-1300.

## CAPITULO II

### **Expressão gênica em oócitos e células do cumulus de oócitos imaturos, maturados *in vivo* ou cultivados em meio de maturação *in vitro* suplementado com diferentes concentrações de EGF.**

Este artigo será submetido ao periódico Livestock Science e encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas. Contudo, está sendo utilizada a língua portuguesa e as figuras estão entre os parágrafos dos resultados apenas para facilitar a leitura e discussão da tese.

**Título:** Expressão gênica em oócitos e células do cumulus de oócitos imaturos, maturados *in vivo* ou cultivados em meio de maturação *in vitro* suplementado com diferentes concentrações de EGF.

**Autores:** Diego Gouvêa de Souza<sup>1</sup>, Fernanda Nunes Marqui<sup>1</sup>, Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli<sup>2</sup>, Andressa Vilas Boas Nogueira<sup>2</sup>, Alicio Martins Jr.<sup>3</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>.

**Filiações:** 1 – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil. 2 – Diagnóstico e Cirurgia – FOAR, UNESP, Araraquara, Brasil. 3 - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – FMVA, UNESP, Araçatuba, Brasil.

**Resumo:**

O fator de crescimento epidermal (EGF) parece desempenhar um papel importante na maturação oócitaria, mas os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não são muito bem compreendidos. Este estudo teve como objetivo quantificar os transcritos dos genes GDF9, BMP15 e OOSP1 em oócitos, e GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 e ADAM17 nas células do cumulus (CC), a partir de oócitos imaturos (estado de VG), maturados *in vivo* (MIVO) ou cultivados em meio de maturação *in vitro* (MIV) suplementado com EGF na concentração de 0 ng/mL (EGF0), 10 ng/mL (EGF10) e 100 ng/mL (EGF100). Para a maturação *in vitro*, grupos de 20-25 oócitos foram cultivados em Meio 199, acrescido de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, penicilina, FSH e LH, além de estradiol, cisteamina, 10% de SFB e EGF nas concentrações delineadas para cada grupo experimental. Para a MIVO, 10 vacas foram submetidas à superovulação com FSH e os

complexos *cumulus*-oócitos (CCO) obtidos através de “OPU”, 19-20 h após aplicação de gonadorelina. A quantidade relativa de transcritos para o gene *GREM1*, *PTGS2*, *PFKP* e *AREG* foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC de oócitos MIVO do que em VG ou MIV. Entretanto, a maior ( $P < 0,05$ ) abundância para o gene *GREM1* foi observada nas CC de CCO cultivados em meio MIV com 10 ou 100 ng/mL de EGF do que em VG. A *AREG* foi mais ( $P < 0,05$ ) expressa nas CC de oócitos tratados com 10 ng/mL de EGF do que aqueles MIVO, em estado de VG ou em meio de MIV na ausência de EGF e com 100 ng/mL de EGF. As CC do grupo EGF10 mostraram maior ( $P < 0,05$ ) transcrição de *PTGS2*, *VCAN* e *PTX3* do que no grupo EGF100. O grupo EGF100 exibiu menor quantidade relativa de *AREG*, *ADAM10* e *ADAM17* nas CC do que os EGF0 e EGF10. Assim, conclui-se que, a adição de 10 ng/mL de EGF no meio de MIV de oócitos bovinos favoreceu a transcrição de genes indicadores de competência nas CC, por outro lado, a maior expressão nas CC de oócitos maturados *in vivo*, sugere a necessidade de pesquisas voltadas para o estabelecimento de meios e/ou condições de MIV mais eficientes para melhorar a competência oocitária.

**Palavras chave:** Expressão gênica, competência oocitária, MIV, fator de crescimento epidermal.

## 1. Introdução

A maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa crítica para a aquisição de competência de desenvolvimento do oócito e, sendo assim, o meio de maturação e as condições de cultivo assumem papel essencial no estabelecimento de um ambiente que seja propício para que o oócito possa ser fertilizado e, posteriormente, continuar o desenvolvimento embrionário.

A aquisição da competência por partes dos oócitos é afetada por fatores endócrinos, parácrino e autócrino, ocorrendo durante a ovogênese e desenvolvimento folicular, sendo sua importância destacada nos sistemas de cultivo (Li et al., 2008). A MIV está limitada intrinsecamente ao desenvolvimento do oócito, implicando em alterações moleculares e bioquímicas que permitem ao oócito maturado ser fertilizado normalmente e se tornar um embrião (Gilchrist e Thompson, 2007). Durante esta fase as mitocôndrias sintetizam ATP para a síntese protéica durante a maturação e, subsequente, desenvolvimento embrionário (Krisher e Bavister, 1998). A transcrição e estocagem de grande quantidade de material genético nos oócitos não possuem papel seletivo na oogênese, mas são importantes para a regulação da embriogênese (Yurttas et al., 2010), da mesma forma que a ativação da transcrição do genoma embrionário é requerida para o desenvolvimento além do estágio de transição materno-zigoto (Barnes e First, 1991).

O oócito cresce e se desenvolve através de uma relação íntima e dependente das células somáticas adjacentes (Gilchrist et al., 2008). As células do cumulus fornecem ao oócito nutrientes e sinais regulatórios que facilitam a progressão da maturação, especialmente, da maturação nuclear. Entretanto, fatores secretados pelo oócito permitem a diferenciação das células do cumulus, a partir das células murais da granulosa, além de promoverem sua mucificação (Gilchrist et al., 2004). Diversos genes críticos expressos nas células do cumulus estão sob o controle de sinais materno e do oócito, tornando a expressão gênica representativa do estágio de maturação (Gebhardt et al., 2011a).

O fator de crescimento epidermal (EGF) parece desempenhar um papel importante na maturação oocitária, mas os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não são muito bem compreendidos (Gall et al., 2004). Tem sido

demonstrado que os fatores de crescimento semelhante ao EGF são importantes efetores da ação do LH na indução da maturação do oócito dentro do folículo. (Romero e Smitz, 2009). Lonergan et al. (1996) demonstraram que a suplementação do meio de MIV com EGF, em diferentes concentrações (1, 10 e 100 ng/mL), estimulou a expansão das células do cumulus, aumentou a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII, bem como a proporção de embriões bovinos que chegaram ao estágio de blastocisto.

As características morfológicas do citoplasma, corpúsculo polar e das células do cumulus são rotineiramente utilizados para a seleção dos oócitos. Porém, os critérios morfológicos de classificação e triagem dos oócitos são subjetivos e controversos (Li et al., 2008b). No entanto, a relação entre a expressão de genes específicos durante o crescimento folicular e a respectiva capacidade de definir a qualidade do embrião ainda precisam ser investigados mais detalhadamente (Britto Velho et al., 2013).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo quantificar os transcritos dos genes relacionados com potencial de marcação de competência em oócitos (BMP15, GDF9 e OOSP1) e nas células do cumulus (GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 e ADAM17), a partir de oócitos imaturos, maturados *in vivo* ou cultivados em meio de MIV suplementado com diferentes concentrações de EGF. Hipotetizamos que, oócitos maturados *in vivo* apresentarão maior transcrição para genes marcadores de competência, assim como, de modo similar dos oócitos maturados *in vitro* em meio de MIV contendo EGF.

## **2. Material e Métodos**

A menos que especificado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

## 2.1 Grupos experimentais

Cinco grupos de tratamento foram delineados, a saber: oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG), oócitos maturados *in vivo* (MIVO) e oócitos maturados *in vitro* nas concentrações de EGF de 0 (EGF0), 10 (EGF10) e 100 ng/mL (EGF100) de EGF.

### 2.1 Maturação *in vitro*

Ovários de vacas foram colhidos de animais abatidos em frigorífico, no máximo 30 minutos *post-mortem*. O transporte foi feito em garrafa térmica contendo solução fisiológica à temperatura de 31 a 33° C. Folículos de 2-7 mm de diâmetro foram puncionados utilizando agulha calibre 18 G e seringa de 10 mL. O líquido folicular foi colocado em tubo de centrífuga de 15 mL e mantido a 37° C para sedimentação dos complexos cumulus oócito (CCO).

A seguir, os CCO com citoplasma homogêneo e pelo menos 3 a 4 camadas de células do cumulus foram lavados e selecionados em meio PBS com 10% de SFB (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, Brasil). Após a seleção, grupos de 25 oócitos foram transferidos para gotas de 100 µL de meio MIV, dispersas em placa de Petri (60 x 10 mm), sob óleo mineral. O meio de maturação foi constituído de meio 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 1 µg/mL de FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Inc, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canadá), 1 µg/mL de Estradiol (Sigma Co., St. Louis, EUA), 0,10 mM de Cisteamina (Sigma Co., St. Louis, EUA) e diferentes concentrações de EGF (Sigma Co., St. Louis, EUA), conforme o delineamento experimental. A MIV foi conduzida em estufa de cultivo (Forma Scientific, USA), em atmosfera úmida, a 5% CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,8° C, por 24 horas.

## 2.2 *Maturação in vivo (MIVO)*

Os CCO maturados *in vivo* foram obtidos através de “OPU”, a partir de 10 doadoras da raça Nelore, previamente, sincronizadas (D0) com dispositivo intravaginal de progesterona (Primer<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, Brasil). Nos dias 4, 5 e 6 os animais receberam 180 mg de FSH, em seis doses decrescentes, sendo que no D6 foi administrado 0,53 mg de cloprostenol sódico (Ciosin<sup>®</sup>, MSD, Brasil). No D7, o dispositivo intravaginal foi removido e a “OPU” realizada 19 a 20 horas após a aplicação de 2,5 mg de gonadorelina (Fertagyl<sup>®</sup>, Intervet, Brasil). Os CCO com citoplasma homogêneo e células do cumulus expandidas foram selecionados e armazenados à - 80° C para posterior análise.

## 2.3 *Análise da expressão gênica*

As células do cumulus foram removidas através de sucessivas pipetagens, em meio PBS com 0,1% de hialuronidase. As gotas contendo somente as CC foram centrifugadas (3.355 x g/10 min) para formação de sedimento e, então, oócitos desnudos e o sedimento das células do cumulus foram congelados, separadamente, em 350 µL de meio para extração de RNA total, sendo armazenados à - 80° C para posterior análise da expressão gênica.

A extração de RNA foi realizada pelo “RNeasy Micro kit” (Qiagen - Hilden, Alemanha) e quantificada em espectrofotômetro de microvolumes (“NanoVue, GE Healthcare”), considerando a relação A260/A280 entre 1.8 e 2.1, como indicativa da pureza do RNA obtido. Após a purificação, as amostras de RNA foram eluídas em 30 µL de água livre de RNase. O cDNA foi sintetizado com a utilização do kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)”, de acordo com as instruções do fabricante. O RT-PCR foi realizado com reagentes “SYBR<sup>®</sup> Green PCR

Master Mix (Applied Biosystems)”; as reações foram realizadas com volume final de 20  $\mu\text{L}$ , com amplificação dos genes a 95° C/10 min, desnaturação a 95° C/15 s, seguido de anelamento por 1 min (40 ciclos). As sequências dos “primers”, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene são apresentados na Tabela 1.

Os dados de transcritos dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH. Esta reação foi feita em termocicladora “StepOne (Applied Biosystems)” e os resultados analisados através do método  $\Delta$  ( $\Delta\text{Ct}$ ), empregando o “software” da própria termocicladora para quantificação relativa da expressão dos genes alvo, após normalização para o gene constitutivo.

**Quadro 1** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, estrutura celular analisada, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento

Genes	Sequência	Tipo celular analisado	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento(°C)
GAPDH	F 5'- GCGTGAACCACGAGAAGTATAA -3' R 5'- CCCTCCACGATGCCAAAGT -3'	Oócito/Cumulus	119	62
GDF9	F 5'- TGGTCCTTGCTGAAGCATCTAGA -3' R 5'- ACAGTGTGTAGAGGTGGCTTCT -3'	Oócito	202	59
BMP15	F 5'- GTCAGCAGCCAAGAGGTAGTG -3' R 5'- CCCGAGGACATACTCCCTTAC -3'	Oócito	360	59
OOSP1	F 5'- GCCAAGATTAACCCACACTATTT -3' R 5'- ATAATGAGCATCTGGTGAAACGTA -3'	Oócito	182	56
GREM1	F 5'- GTCACACTCAACTGCCCTGA -3' R 5'- GCACACGAACTACGCACAAG -3'	Cumulus	251	57
PTGS2	F 5'- AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA -3' R 5'- TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT -3'	Cumulus	168	60
PFKP	F 5'- TCAGAGAACCGTGCCTGGAAGAAA -3' R 5'- TGACCACAAGCTCCTTGATCTGCT -3'	Cumulus	112	59
AREG	F 5'- CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT -3' R 5'- CGTTCCTCAGCGACACCTTCA -3'	Cumulus	100	60
EREG	F 5'- ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA -3' R 5'- TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT -3'	Cumulus	100	60
HAS2	F 5'- ACACAGACAGGCTGAGGACAACCT -3' R 5'- AAGCAGCTGTGATTCCAAGGAGGA -3'	Cumulus	133	60
VCAN	F 5'- GCACCTGTGTGCCAGGATA -3' R 5'- CAGGGATTAGAGTGACATTCATCA -3'	Cumulus	70	60
PTX3	F 5'- CCTCAGCTATCGGTCATAA -3' R 5'- ATTGAAGCCTGTGAGGCTGC -3'	Cumulus	294	54
ADAM10	F 5'- ACCCCCCAAAGTCTCTCACA -3' R 5'- AATCATGCGGAGATCCAAAGTT -3'	Cumulus	210	60
ADAM17	F 5'- TGGGATGTGAAGATGTTGCTAGA -3' R 5'- ATCCAAGTGTCCCATATCAAAATC -3'	Cumulus	105	60

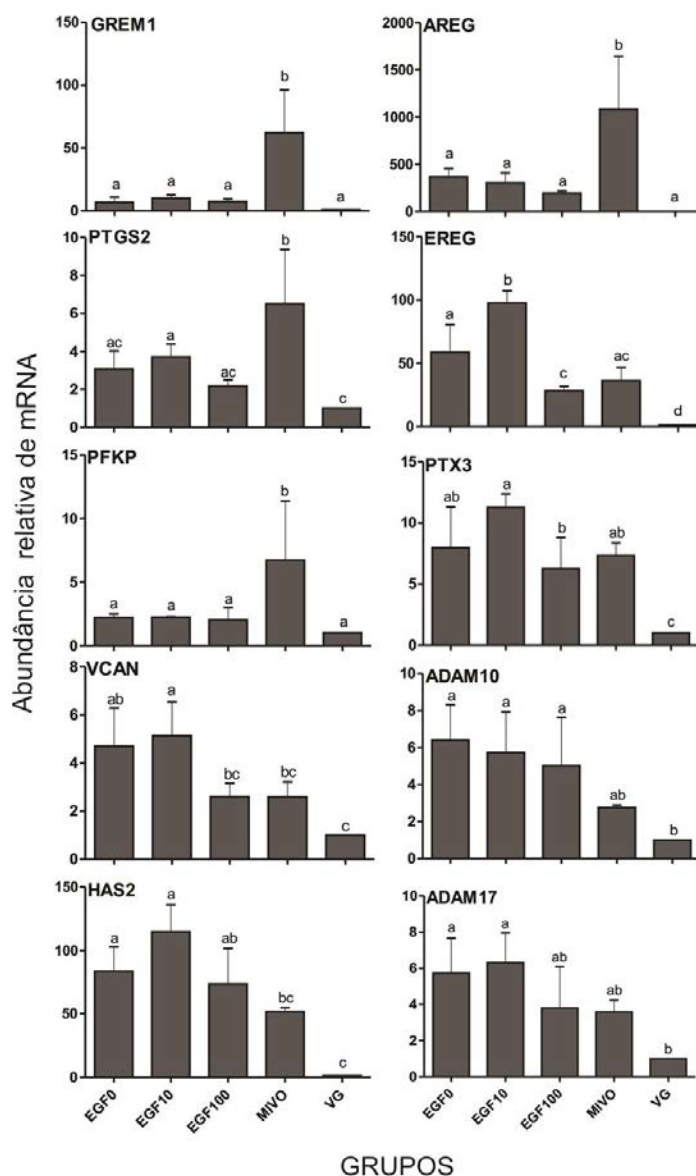
#### 2.4 Análise estatística

Os dados relativos à expressão gênica de oócitos e células do cumulus foram analisados através de ANOVA, sendo a diferença entre as médias determinada pelo teste de Tukey e  $P < 0,05$  considerado como significativo. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3. Resultados

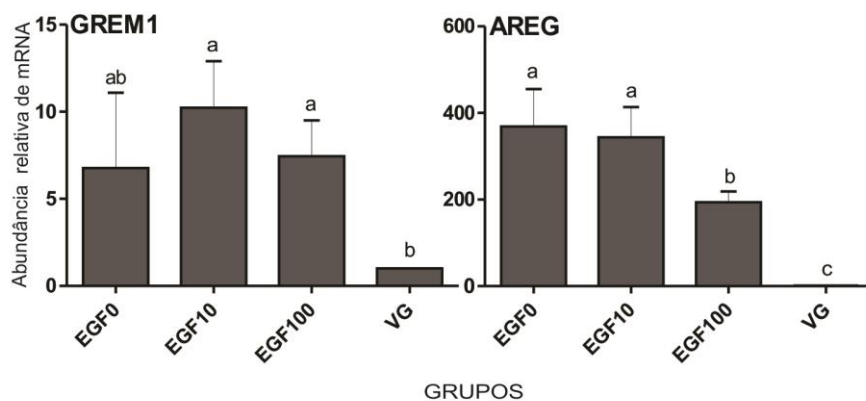
*3.1 Comparação entre a expressão gênica nas células do cumulus de oócitos imaturos, maturados in vitro, em meio com diferentes concentrações de EGF, e oócitos maturados in vivo, seguido de OPU.*

Os resultados da expressão gênica de GREM1, PTGS2, PFKP, VCAN, HAS2, AREG, EREG, PTX3, ADAM10, ADAM17 nas células do cumulus encontram-se descritas na Figura 1. A abundância relativa de mRNA de GREM1, PTGS2, PFKP e AREG foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC de oócitos MIVO do que em oócitos imaturos ou maturados *in vitro*. *In vitro*, a abundância relativa do mRNA de GREM1 foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC dos grupos EGF10 e EGF100 do que no grupo VG, por outro lado, o AREG apresentou maior quantidade transcrito ( $P < 0,05$ ) nos grupos EGF0 e EGF10 do que EGF100 e VG (Figura 2). As CC de oócitos imaturos exibiram uma menor quantidade de PTGS2 do que EGF10 e resultados similares com EGF0 e EGF100. O grupo EGF100 e os oócitos MIVO apresentaram uma menor quantidade relativa de VCAN nas CC do que o EGF10 e não diferiu do grupo VG. As CC de oócitos MIVO mostraram menor abundância de HAS2 do que os grupos EGF0 e EGF10, e, contudo, não diferiu dos oócitos imaturos. O EREG foi mais expresso nas CC de EGF10 e EGF100 ( $P < 0,05$ ), não diferenciando ( $P > 0,05$ ) do grupo VG. As CC do grupo EGF10 exibiram maior abundância de PTX3 do que o grupo EGF100 ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na quantidade relativa de ADAM17 nas CC entre os grupos EGF100, MIVO e VG e para ADAM10 entre o grupo VG e MIVO.



**Figura 1** – Comparação da abundância de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de EGF (EGF0, 0 ng/mL; EGF10, 10 ng/mL; EGF100, 100 ng/mL), oócitos maturados *in vivo* (MIVO) e oócitos imaturos (VG).

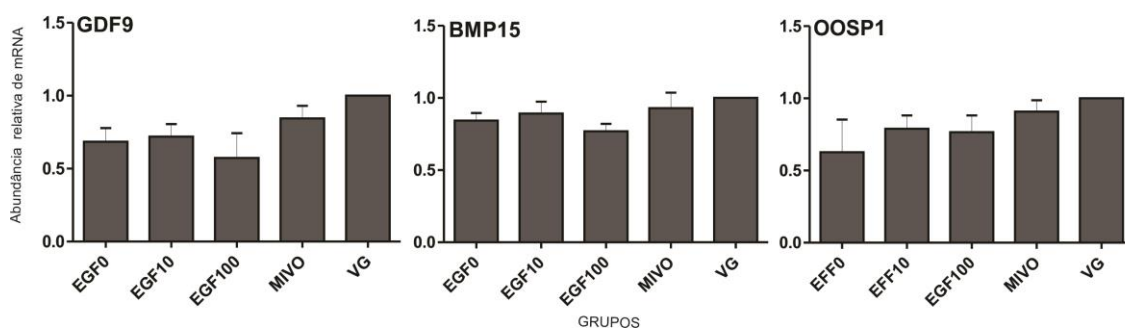
Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2** – Comparação da abundância de transcritos GREM1 e AREG nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de EGF (EGF0, 0 ng/mL; EGF10, 10 ng/mL; EGF100, 100 ng/mL) e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 Efeito das diferentes concentrações de EGF na expressão gênica nos oócitos

Não houve diferença entre a expressão gênica de GDF9, BMP15 e OOSP1 de oócitos maturados *in vitro*, meio contendo diferentes concentrações de EGF, e oócitos maturados *in vivo* e imaturos (Figura 3).



**Figura 3** - Quantidade relativa de transcritos de GDF9, BMP15 e OOSP1 entre oócitos maturados *in vitro*, em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de EGF (EGF0, 0 ng/mL; EGF10, 10 ng/mL; EGF100, 100 ng/mL) oócitos maturados *in vivo* (MIVO) e oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

O EGF parece desempenhar um papel importante na aquisição da competência e desenvolvimento do oócito, porém, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não são bem compreendidos (Gall et al., 2004). Há poucas pesquisas direcionadas ao estudo de influência no processo de transcrição durante a maturação oocitária. Portanto, a quantificação de genes nos oócitos e CC, após a maturação *in vitro*, pode auxiliar no esclarecimento de eventos ocorridos e, assim, estabelecer meios de maturação e/ou condições mais eficientes para induzir completa competência oocitária.

A maior abundância de GREM1 nas CC de oócitos maturados *in vivo*, assim como, no grupo maturado *in vitro*, em meio contendo EGF, pode indicar uma condição de maturação oocitária mais eficiente, sugerindo que, o gene GREM1 possa estar associado com o grau de qualidade do embrião (McKenzie et al., 2004; Pangas et al., 2004; Gebhardt et al., 2011a). No entanto, a relação entre a qualidade do oócito e a expressão de GREM1 ainda não está muito clara (Cillo et al., 2007). O GREM1 é um antagonista da sinalização da proteína morfogénica do osso (BMP), regulada pelo GDF9 (McKenzie et al., 2004). Dados recentes indicam seu envolvimento na via de sinalização intrafolicular de BMP o qual contribui para a regulação negativa da produção de andrógenos tecais (Cillo et al., 2007). A regulação diferencial de BMP, através de GREM1, pode contribuir simultaneamente para a luteinização das células da granulosa e expansão das células do cumulus e, portanto, na maturação final dos oócitos (Pangas et al., 2004). Assim, a expressão contínua de GREM1 nas células do cumulus pode indicar um oócito maduro e, desta forma, inferir um melhor desenvolvimento do embrião (McKenzie et al., 2004).

A AREG e EREG são membros da família de fatores de crescimento semelhante ao EGF (Prochazka et al., 2011; Romero e Smitz, 2009). A ativação do receptor de EGF (EGFR) nas células do cumulus desencadeia a maturação nuclear e a aquisição da competência do oócito, bem como a expansão das CC (Conti et al., 2006; Romero e Smitz, 2009). Neste estudo, observou-se a maior transcrição de AREG nas CC dos oócitos maturados *in vivo*; sua expressão pode desencadear mudanças que sinalizam a retomada da meiose (Ashkenazi et al., 2005; Conti et al., 2006), podendo, ainda, influenciar efetivamente a qualidade do oócito (Zamah et al., 2010). Contudo, a adição de 100 ng/mL de EGF no meio de MIV determinou uma regulação negativa de AREG e EREG nas CC, por outro lado, a baixa concentração de EGF (10 ng/mL) não alterou a transcrição de AREG, mas aumentou a abundância relativa de mRNA para EREG.

As moléculas com afinidade ao EGFR são clivadas proteolicamente por uma atividade específica da metaloproteases de ADAMs, resultando na produção de ligantes solúveis e na estimulação do EGFR de forma autócrina e parácrina (Higashiyama et al., 2008). Apenas as CC de oócitos maturados *in vitro*, em meio ausente ou com baixa concentração de EGF, exibiram abundância relativa de mRNA para ADAM10 do que o grupo de oócitos imaturos. A ADAM10 é a principal protease de EGF e de betacelulina, e a ADAM17 para o EREG, TGF $\alpha$ , AREG e do fator de crescimento semelhante ao EGF, ligado à heparina (Sahin et al., 2004). Muitas dessas ações são fundamentais para a ação do LH, incluindo a expansão do cumulus, maturação oocitária e ovulação (Li et al., 2009).

Os genes PTGS2 e PFKP foram mais expressos nas CC de oócitos maturados *in vivo* do que nas CC de oócitos maturados *in vitro* e oócitos imaturos. *In vitro*, observamos que somente as CC de oócitos maturados *in vitro* em meio contendo baixa concentração de EGF (10 ng/mL) apresentou uma maior quantidade de transcrito de

PTGS2 do que nas CC de oócitos imaturos. O gene PTGS2 codifica a enzima COX2, que sintetiza as prostaglandinas, sendo que sua expressão em CC está relacionada com o tempo de maturação e a qualidade dos oócitos (Gebhardt et al., 2011b). A PFKP exerce função relacionada com a atividade glicolítica nas CC e tem demonstrado uma correlação positiva para gestação (Sugiura et al., 2007; Gebhardt et al., 2011b).

As CC de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com 100 ng/mL de EGF, apresentaram uma menor transcrição de mRNA para VCAN e PTX3 do que oócitos maturados em baixa concentração de EGF (10 ng/mL). Os genes VCAN, PTX3 e HAS2 são ativados pelos receptores de EGF (EGFR) nas CC e acham-se relacionados com a formação da matriz extracelular, como produção do ácido hialurônico, e possuem correlação positiva com o desenvolvimento da competência oócitaria (Salustri et al., 2004; Conti et al., 2006; Adriaenssens et al., 2011; Caixeta et al., 2013).

As CC de oócitos maturados *in vivo* exibiram transcrição similar de mRNA para os genes VCAN, HAS2, ADAM10 e ADAM17 nas CC em comparação com os oócitos imaturos, podendo ser decorrente da condição natural no folículo, por uma influência da superovulação, devido ao tempo de recuperação do oócito, após a aplicação do GNRH.

O GDF9, BMP15 e OOSP1 são fatores secretados pelo oócito, tendo papel essencial no desenvolvimento da foliculogênese, ovulação, fertilização e desenvolvimento do embrião (Caixeta et al., 2009). Não foi observada, neste trabalho, diferença para a quantidade de transcritos de GDF9, BMP15 e OOSP1 entre os oócitos imaturos, maturados *in vitro* e *in vivo*. Li et al. (2008a) e Kathirvel et al. (2013) observaram em porcas e búfalas, respectivamente, que o gene GDF9 foi expresso em maior quantidade em oócitos imaturos, declinando durante o processo de maturação, diferentemente, o BMP15 aumentou com o decorrer do período de 12-18 horas de

maturação, decaindo na sequência. A maior abundância relativa em oócitos imaturos pode ser atribuída ao fato de que após a retomada a meiose, os oócitos apresentam estado de cromatina condensada e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição na transcrição (Tomek et al., 2002).

A menor transcrição de mRNA para os genes GREM1, PTGS2, PFKP e AREG nas CC de oócitos maturados *in vitro*, provavelmente decorrem do ambiente *in vitro* que é menos eficiente do que o *in vivo* (Rizos et al., 2002). Apesar da suplementação no meio de MIV de oócitos com 10 ng/mL de EGF propiciar maior transcrição nas CC, o discreto efeito apresentado em comparação ao grupo isento de EGF pode ter sido mascarado pela presença do SFB no meio de MIV, o qual insere ao meio diversos compostos indefinidos e, entre eles, fatores de crescimento com grande poder mitogênico em diferentes tipos celulares (Zheng et al., 2006), tal como nas células da granulosa (Lorenzo et al., 1994), possuindo, ainda, grande habilidade para regular o desenvolvimento folicular e a maturação dos oócitos (Zhang et al., 2010). Portanto, o ideal seria que pesquisas com suplementação de EGF e outros componentes em meio de MIV, fossem realizados em meios quimicamente definidos. Assim, conclui-se que, a utilização de EGF na MIV de oócitos bovinos possui potencial para melhorar a qualidade da maturação oocitária, visto que favoreceu a transcrição de genes indicadores de competência nas CC. Entretanto, a maior expressão de GREM1, PTGS2, PFKP e AREG nas CC de oócitos maturados *in vivo*, indica a necessidade de pesquisas voltadas para o estabelecimento de meios e/ou condições de MIV mais eficientes para melhorar a competência oocitária.

## Referências bibliográficas

- Adriaenssens, T., Segers, I., Wathlet, S., Smits, J., 2011. The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. *Journal of assisted reproduction and genetics* 28, 31-40.
- Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M., Tsafiriri, A., 2005. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146, 77-84.
- Barnes, F.L., First, N.L., 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Molecular reproduction and development* 29, 117-123.
- Caixeta, E.S., Ripamonte, P., Franco, M.M., Junior, J.B., Dode, M.A., 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, fertility, and development* 21, 655-664.
- Caixeta, E.S., Sutton-McDowall, M.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., Price, C.A., Machado, M.F., Lima, P.F., Buratini, J., 2013. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 146, 27-35.
- Cillo, F., Brevini, T.A., Antonini, S., Paffoni, A., Ragni, G., Gandolfi, F., 2007. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 134, 645-650.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y., Su, Y.Q., 2006. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715-723.
- Gall, L., Chene, N., Dahirel, M., Ruffini, S., Boulesteix, C., 2004. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. *Molecular reproduction and development* 67, 439-445.
- Gardner, D.K., 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell biology international* 18, 1163-1179.
- Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russel, D.L., 2011a. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and Sterility* 96, 42-52.
- Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russell, D.L., 2011b. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and sterility* 96, 47-52 e42.
- Gilchrist, R.B.; Albuz, F.K.; Thompson, J.G., 2010. A new approach to in vitro maturation (IVM) and embryo in vitro production: induced IVM substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Reproduction, Fertility and Development* 22, 293-293.
- Gilchrist, R.B., Lane, M., Thompson, J.G., 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update* 14, 159-177.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T., 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal reproduction science* 82-83, 431-446.
- Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67, 6-15.

- Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H., Matsushita, N., 2008. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer science* 99, 214-220.
- Kathirvel, M., Soundian, E., Kumanan, V., 2013. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 () and Bone morphogenetic factor15 () mRNA transcripts during maturation of buffalo () cumulus-oocyte complexes. *SpringerPlus* 2, 206.
- Keskintepe, L., Burnley, C.A., Brackett, B.G., 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biology of reproduction* 52, 1410-1417.
- Korhonen, K., Kananen, K., Ketoja, E., Matomaki, J., Halmekyto, M., Peippo, J., 2010. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 45, 42-49.
- Krisher, R.L., Bavister, B.D., 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49, 103-114.
- Li, H.K., Kuo, T.Y., Yang, H.S., Chen, L.R., Li, S.S., Huang, H.W., 2008a. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Animal reproduction science* 103, 312-322.
- Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.J., Smith, G.W., 2009. Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction* 137, 297-307.
- Li, Q., McKenzie, L.J., Matzuk, M.M., 2008b. Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular human reproduction* 14, 673-678.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonckt, A., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, P., 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biology of reproduction* 54, 1420-1429.
- Lorenzo, P.L., Illera, M.J., Illera, J.C., Illera, M., 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of reproduction and fertility* 101, 697-701.
- McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., Matzuk, M.M., 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 19, 2869-2874.
- Mingoti, G.Z., Garcia, J.M., Rosa-e-Silva, A.A., 2002. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal reproduction science* 69, 175-186.
- Pangas, S.A., Jorgez, C.J., Matzuk, M.M., 2004. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *The Journal of biological chemistry* 279, 32281-32286.
- Prochazka, R., Petlach, M., Nagyova, E., Nemcova, L., 2011. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction* 141, 425-435.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro

- versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development* 61, 234-248.
- Romero, S., Smitz, J., 2009. Epiregulin can effectively mature isolated cumulus-oocyte complexes, but fails as a substitute for the hCG/epidermal growth factor stimulus on cultured follicles. *Reproduction* 137, 997-1005.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C.P., 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology* 164, 769-779.
- Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., Doni, A., Bastone, A., Mantovani, G., Beck Peccoz, P., Salvatori, G., Mahoney, D.J., Day, A.J., Siracusa, G., Romani, L., Mantovani, A., 2004. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 131, 1577-1586.
- Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J., 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 134, 2593-2603.
- Tomek, W., Torner, H., Kanitz, W., 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 37, 86-91.
- Watson, A.J., De Sousa, P., Caveney, A., Barcroft, L.C., Natale, D., Urquhart, J., Westhusin, M.E., 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of reproduction* 62, 355-364.
- Yurttas, P., Morency, E., Coonrod, S.A., 2010. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction* 139, 809-823.
- Zamah, A.M., Hsieh, M., Chen, J., Vigne, J.L., Rosen, M.P., Cedars, M.I., Conti, M., 2010. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 25, 2569-2578.
- Zhandi, M., Towhidi, A., Nasr-Esfahani, M.H., Eftekhari-Yazdi, P., Zare-Shahneh, A., 2009. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. *Journal of assisted reproduction and genetics* 26, 605-611.
- Zhang, K., Hansen, P.J., Ealy, A.D., 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction* 140, 815-826.
- Zheng, X., Baker, H., Hancock, W.S., Fawaz, F., McCaman, M., Pungor, E., Jr., 2006. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology progress* 22, 1294-1300.

### **CAPITULO III**

#### **Quantificação de mRNA em oócitos e nas células do cumulus de oócitos imaturos, cultivados *in vivo* ou *in vitro* previamente pré-maturados em butirolactona I.**

Este artigo será submetido ao periódico Animal Reproduction Science e encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas. Contudo, está sendo utilizada a língua portuguesa e as figuras estão entre os parágrafos dos resultados apenas para facilitar a leitura e discussão da tese.

**Título:** Quantificação de mRNA em oócitos e nas células do cumulus de oócitos imaturos, cultivados *in vivo* ou *in vitro* previamente pré-maturados em butirolactona I.

**Autores:** Diego Gouvêa de Souza<sup>1</sup>, Fernanda Nunes Marqui<sup>1</sup>, Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli<sup>2</sup>, Andressa Vilas Boas Nogueira<sup>2</sup>, Cyntia Ludovico Martins<sup>3</sup>, Alicio Martins Jr.<sup>4</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>.

**Filiações:** 1 – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil. 2 – Diagnóstico e Cirurgia – FOAR, UNESP, Araraquara, Brasil. 3 – Departamento de Produção Animal, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil. 4 – Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – FMVA, UNESP, Araçatuba, Brasil.

**Resumo:**

Na tentativa de melhorar a competência dos oócitos, alguns inibidores das quinases dependentes de ciclina, como a butirolactona I (BLI), têm sido utilizados para sincronizar a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos. Este estudo teve como objetivo quantificar os transcritos dos genes GDF9, BMP15 e OOSP1 em oócitos, e GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 e ADAM17 nas células do cumulus (CC), a partir de oócitos imaturos (VG), maturados *in vivo* (MIVO) ou pré-maturados com 10 µM de BLI anteriormente a maturação *in vitro* (MIV), a saber: BL0 (bloqueio da meiose, 0h; MIV, 24h), BL12 (bloqueio da meiose, 12h; MIV, 12h) e BL24 (bloqueio da meiose, 24h; MIV, 24h). Para a MIVO, 10 vacas foram submetidas à superovulação com FSH e os complexos cumulus-oócitos obtidos através de “OPU”, 19-20 h após indução da ovulação. A quantidade relativa de

transcrito para o gene *GREM1* foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC de oócitos MIVO do que em VG ou MIV e maior em BL12 do que BL0, BL24 e VG. A maior ( $P < 0,05$ ) abundância foi observada de *PTGS2* e *PFKP* nas CC de oócitos MIVO e de *PTGS2* no grupo BL24 em comparação ao BL12 e VG. O gene *PTX3* foi mais expresso ( $P < 0,05$ ) nas CC do grupo BL24 do que no BL0, MIVO e VG. A *AREG* apresentou mais expressa ( $P < 0,05$ ) nas CC do grupo BL12. A expressão gênica de *EREG* foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC do grupo BL24 do que no BL0. No grupo BL0 maior ( $P < 0,05$ ) expressão gênica foi observada para *PFKP* do que para BL12 e VG. Concluindo, a pré-maturação com BLI favoreceu a transcrição nas células do cumulus de genes associados à competência oocitária. No entanto, mais estudos com bloqueio meiótico em oócitos devem ser realizados para investigar mais profundamente a ação de determinados genes sobre a funcionalidade do oócito.

**Palavras chave:** Expressão gênica, competência oocitária, MIV, BLI, bloqueio meiótico.

## 1. Introdução

Inibidores do reinício da meiose, como a roscovitina e a butirolactona I (BLI), têm sido utilizados com o intuito de aumentar o tempo de maturação citoplasmática *in vitro* e, conseqüentemente, melhorar a capacitação de oócitos bovinos durante a MIV (Adona et al., 2008).

Em condições *in vivo*, a maturação oocitária é um processo induzido, através do qual o aprisionamento meiótico, mediado pelo AMPc, é sobrepujado pela onda de gonadotrofina antes da ovulação (Gilchrist et al., 2010). Em comparação com os oócitos

maturados *in vivo*, os quais ainda estão em processo de adquirir competência para desenvolvimento, oócitos maturados *in vitro* sofrem maturação prematura, sendo que a cascata molecular, a qual dá reinício à meiose, difere inteiramente daquela que ocorre *in vivo* (Gilchrist e Thompson, 2007). Sendo assim, a retomada da meiose ocorre quando o oócito é libertado da influência de fatores de inibição presentes no folículo (Kotsuji et al., 1994), levando alguns oócitos a reassumirem a meiose sem adquirir plena capacitação.

Os bloqueadores meióticos inseridos no cultivo atuam inibindo seletivamente as quinases, mais especificamente a proteína quinase p34<sup>CDC2</sup>, também, conhecida como quinase CDK2 e CDK1, o qual integra o Fator Promotor de Maturação (MPF) (Kubelka et al., 2000; Vigneron et al., 2004). Portanto, tem sido observado que, apesar de inibir a meiose, a pré-maturação com inibidores de CDK não bloqueiam completamente a maturação, permanecendo ativos eventos de condensação cromossômica e invaginação do envelope nuclear (Kubelka et al., 2000; Leal et al., 2012).

Durante o desenvolvimento do oócito, as mitocôndrias sintetizam ATP para que ocorra a síntese protéica necessária para promover a maturação e, posterior, desenvolvimento embrionário (Krisher e Bavister, 1998). Transcrição e estocagem de grande quantidade de material nos oócitos não tem um papel seletivo na oogênese, mas são importantes para a regulação da embriogênese (Yurttas et al., 2010). Além disso, a ativação da transcrição do genoma embrionário é requerida para o desenvolvimento além do estágio de transição materno-zigoto (Barnes e First, 1991).

As células do cumulus fornecem ao oócito nutrientes e sinais regulatórios que facilitam a progressão da maturação, especialmente, da maturação nuclear. Entretanto, fatores secretados pelo oócito permitem a diferenciação das células do cumulus, a partir das células murais da granulosa, além de sua mucificação (Gilchrist et al., 2004).

Muitos genes críticos expressos nas células do cumulus para o desenvolvimento do oócito estão sob o controle de sinais tanto materno quanto derivado do oócito, sendo essa expressão representativa do estágio de maturação (Gebhardt et al., 2011a). Contudo, foi observado que o bloqueio meiótico do oócito utilizando BLI na pré-maturação inibiu a transcrição de determinados genes, mas não causou uma inibição global. (Leal et al., 2012).

Assim, este estudo teve como objetivo quantificar transcritos de genes com grande potencial de marcação de competência em oócitos (BMP15, GDF9 e OOSP1) e nas células do cumulus (GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 e ADAM17), a partir de oócitos imaturos, maturados *in vivo* ou pré-maturados em meio com BLI previamente à maturação *in vitro*. Hipotetizamos que, oócitos e CC de oócitos maturados *in vivo*, bem como *in vitro*, após o bloqueio meiótico com BLI, apresentarão maior abundância de transcritos para os genes marcadores de competência oocitária do que os oócitos imaturos.

## **2. Material e Métodos**

A menos que especificado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

### *2.1 Grupos experimentais*

Cinco grupos de tratamento foram delineados, a saber: oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG), oócitos maturados *in vitro* (BL0), oócitos maturados *in vitro* por 12h após a pré-maturação com BL-I por 12h (BL12), oócitos maturados *in vitro* por 24h após a pré-maturação com BL-I por 24h (BL24), e oócitos maturados *in vivo* (MIVO).

### 2.1 Pré-maturação e maturação *in vitro*

Ovários de vacas foram colhidos de animais abatidos em frigorífico, no máximo 30 minutos *post-mortem*. O transporte foi feito em garrafa térmica contendo solução fisiológica à temperatura de 31 a 33° C. Folículos de 2-7 mm de diâmetro foram puncionados utilizando agulha calibre 18 G e seringa de 10 mL. O líquido folicular foi colocado em tubo de centrífuga de 15 mL e mantido a 37° C para sedimentação dos complexos cumulus oócito (CCO).

A seguir, os CCO com citoplasma homogêneo e pelo menos 3 a 4 camadas de células do cumulus foram lavados três vezes e selecionados em meio PBS com 10% de SFB (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, Brasil). Após a seleção, grupos de 25 oócitos foram transferidos para gotas de 100 µL de meio de pré-maturação, dispersas em placa de Petri (60x10mm), sob óleo mineral. O meio de pré-maturação constituído de meio 199 (Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina e 10 µM de butirolactona I. A incubação foi conduzida em estufa de cultura (Forma Scientific, USA), em atmosfera úmida, a 5% CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,8°C, com o tempo de cultivo conforme cada grupo experimental.

Após a pré-maturação, os oócitos foram submetidos à maturação *in vitro* em gotas de 100 µL de meio MIV, dispersas em placa de Petri (60x10mm), sob óleo mineral. O meio de maturação constituído de meio 199 (Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 1 µg/mL de FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Inc, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canadá), 1 µg/mL de Estradiol (Sigma Co., St. Louis, EUA), 0,10 mM de Cisteamina (Sigma Co., St. Louis, EUA) e 10% de SFB.

A MIV foi conduzida em estufa de cultivo (Forma Scientific, USA), em atmosfera úmida, a 5% CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,8° C, com o tempo conforme o delineamento experimental.

### *2.2 Maturação in vivo (MIVO)*

Os CCO maturados *in vivo* foram obtidos através de “OPU” a partir de 10 doadoras da raça Nelore, previamente, sincronizadas (D0) com dispositivo intravaginal de progesterona (Primer<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, Brasil). Nos dias 4, 5 e 6 os animais receberam 180 mg de FSH, em seis doses decrescentes, sendo que no D6 foi administrado 0,53 mg de cloprostenol sódico (Ciosin<sup>®</sup>, MSD, Brasil). No D7, o dispositivo intravaginal foi removido e a “OPU” realizada 19 a 20 horas após a aplicação de 2,5 mg de gonadorelina (Fertagyl<sup>®</sup>, Intervet, Brasil). Os CCO com citoplasma homogêneo e células do cumulus expandidas foram armazenados à - 80° C para posterior análise.

### *2.3 Análise da expressão gênica*

As células do cumulus foram removidas através de sucessivas pipetagens, em meio PBS com 0,1% de hialuronidase. As gotas contendo somente as CC foram centrifugadas (3.355 x g/10 min) para formação de sedimento e, então, oócitos desnudos e o sedimento das células do cumulus foram congelados, separadamente, em 350 µL de meio para extração de RNA total, sendo armazenados à - 80° C para posterior análise da expressão gênica.

A extração de RNA foi realizada pelo “RNeasy Micro kit” (Qiagen - Hilden, Alemanha) e quantificada em espectrofotômetro de microvolumes (“NanoVue, GE Healthcare”), considerando a relação A260/A280 entre 1.8 e 2.1, como indicativa da pureza do RNA obtido. Após a purificação, as amostras de RNA foram eluídas em 30

$\mu\text{L}$  de água livre de RNase. O cDNA foi sintetizado com a utilização do kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)”, de acordo com as instruções do fabricante. O RT-PCR foi realizado com reagentes “SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)”; as reações foram realizadas com volume final de 20  $\mu\text{L}$ , com amplificação dos genes a 95° C/10 min, desnaturação a 95° C/15 s, seguido de anelamento por 1 min (40 ciclos). As sequências dos “primers”, tamanho do fragmento e temperatura de anelamento para cada gene são apresentados na Tabela 1.

Os dados de transcritos dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH. Esta reação foi feita em termocicladora “StepOne (Applied Biosystems)” e os resultados analisados através do método  $\Delta$  ( $\Delta\text{Ct}$ ), empregando o “software” da própria termocicladora para quantificação relativa da expressão dos genes alvo, após normalização para o gene constitutivo.

**Quadro 1** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, estrutura celular analisada, tamanho do fragmento amplificado em pb (pares de base) e temperatura de anelamento

Genes	Sequência	Tipo celular analisado	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento(°C)
GAPDH	F 5'- GCGTGAACCACGAGAAGTATAA -3' R 5'- CCCTCCACGATGCCAAAGT -3'	Oócito/Cumulus	119	62
GDF9	F 5'- TGGTCCTTGCTGAAGCATCTAGA -3' R 5'- ACAGTGTGTAGAGGTGGCTTCT -3'	Oócito	202	59
BMP15	F 5'- GTCAGCAGCCAAGAGGTAGTG -3' R 5'- CCCGAGGACATACTCCCTTAC -3'	Oócito	360	59
OOSP1	F 5'- GCCAAGATTAACCCACACTATTT -3' R 5'- ATAATGAGCATCTGGTGAAACGTA -3'	Oócito	182	56
GREM1	F 5'- GTCACACTCAACTGCCCTGA -3' R 5'- GCACACGAACTACGCACAAG -3'	Cumulus	251	57
PTGS2	F 5'- AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA -3' R 5'- TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT -3'	Cumulus	168	60
PFKP	F 5'- TCAGAGAACCGTGCCTGGAAGAAA -3' R 5'- TGACCACAAGCTCCTTGATCTGCT -3'	Cumulus	112	59
AREG	F 5'- CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT -3' R 5'- CGTTCCTCAGCGACACCTTCA -3'	Cumulus	100	60
EREG	F 5'- ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA -3' R 5'- TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT -3'	Cumulus	100	60
HAS2	F 5'- ACACAGACAGGCTGAGGACAACCT -3' R 5'- AAGCAGCTGTGATTCCAAGGAGGA -3'	Cumulus	133	60
VCAN	F 5'- GCACCTGTGTGCCAGGATA -3' R 5'- CAGGGATTAGAGTGACATTCATCA -3'	Cumulus	70	60
PTX3	F 5'- CCTCAGCTATCGGTCATAA -3' R 5'- ATTGAAGCCTGTGAGGCTGC -3'	Cumulus	294	54
ADAM10	F 5'- ACCCCCCAAAGTCTCTCACA -3' R 5'- AATCATGCGGAGATCCAAAGTT -3'	Cumulus	210	60
ADAM17	F 5'- TGGGATGTGAAGATGTTGCTAGA -3' R 5'- ATCCAAGTGTCCCATATCAAAATC -3'	Cumulus	105	60

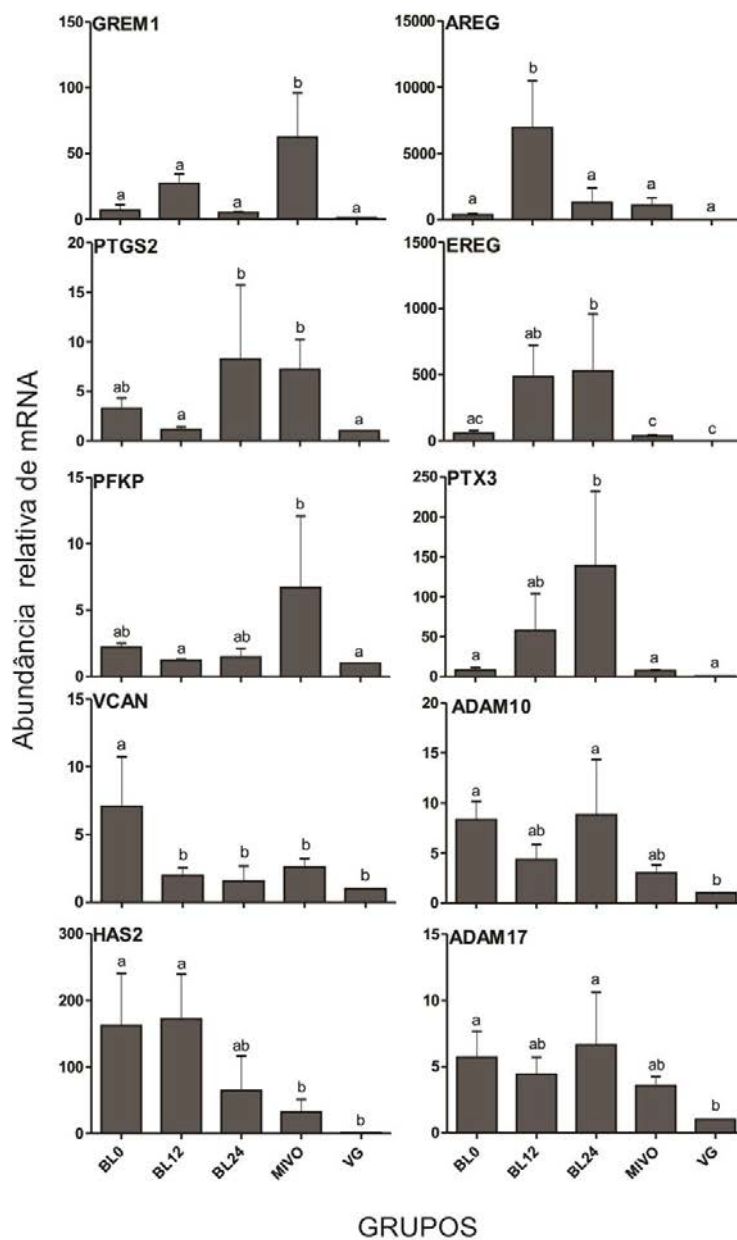
#### 2.4 Análise estatística

Os dados relativos à expressão gênica de oócitos e células do cumulus foram analisados através de ANOVA, sendo a diferença entre as médias determinada pelo teste de Tukey e  $P < 0,05$  considerado como significativo. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média.

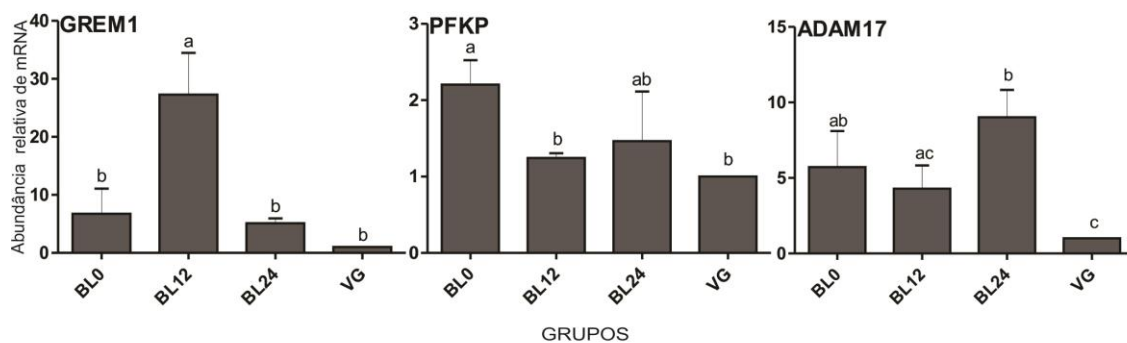
### 3. Resultados

#### 3.1 Comparação entre expressão gênica nas células do cumulus de oócitos imaturo, maturados *in vitro* após pré-maturação em butilolactona I, e oócitos maturados *in vivo*, seguido de OPU.

Os resultados da expressão dos genes GREM1, PTGS2, PFKP, VCAN, HAS2, AREG, EREG, PTX3, ADAM10 e ADAM17 nas células do cumulus encontram-se descrita na Figura 1. A abundância relativa de mRNA de GREM1 foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC dos oócitos MIVO do que em oócitos VG ou MIV. A maior abundância de transcritos de mRNA foi observada nas CC de oócitos MIVO para PTGS2 e PFKP e o para PTGS2 no BL24, do que no grupo BL12 e VG ( $P < 0,05$ ). A expressão gênica nas CC de HAS2 foi maior ( $P < 0,05$ ) no BL0 e BL12 do que nos oócitos MIVO e VG, não havendo entre BL24, oócitos MIVO e MIV. O gene VCAN e AREG apresentaram mais transcritos nas CC ( $P < 0,05$ ) no grupo BL0 e BL12, respectivamente. A expressão gênica de EREG foi maior ( $P < 0,05$ ) nas CC do BL24 do que do BL0, além disso, apenas as CC do BL12 e BL24 apresentaram maior abundância de transcritos ( $P < 0,05$ ) para EREG do que as CC de oócitos imaturos. O gene PTX3 foi mais ( $P < 0,05$ ) expresso nas CC do BL24 do que no BL0, oócitos MIV e VG. O BL12 e os oócitos MIVO exibiram uma abundância relativa de transcritos para ADAM10 e ADAM17 nas CC, resultado similar aos obtidos nas CC de oócitos imaturos. Entretanto, entre os grupos maturados *in vitro*, também foi observada uma diferença ( $P < 0,05$ ) na expressão gênica de GREM1, PFKP e ADAM17, conforme dados descritos na Figura 2. O gene GREM1 foi mais expresso nas CC do grupo BL12 ( $P < 0,05$ ) do que no BL0, BL24 e VG. O grupo BL0 exibiu maior expressão gênica de PFKP ( $P < 0,05$ ) do que o BL12 e VG. As CC do BL12 exibiram expressão de ADAM17 menor ( $P < 0,05$ ) do que BL24, porém com resultados similares ( $P > 0,05$ ) ao BL0 e VG.



**Figura 1** – Comparação entre os níveis de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro* na ausência (BL0) ou presença de bloqueio meiótico com BLI (BL12, 12 h de bloqueio da meiose e MIV; BL24, 24 h de bloqueio da meiose e MIV) e oócitos maturados *in vivo* (MIVO) ou oócitos imaturos (VG). Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

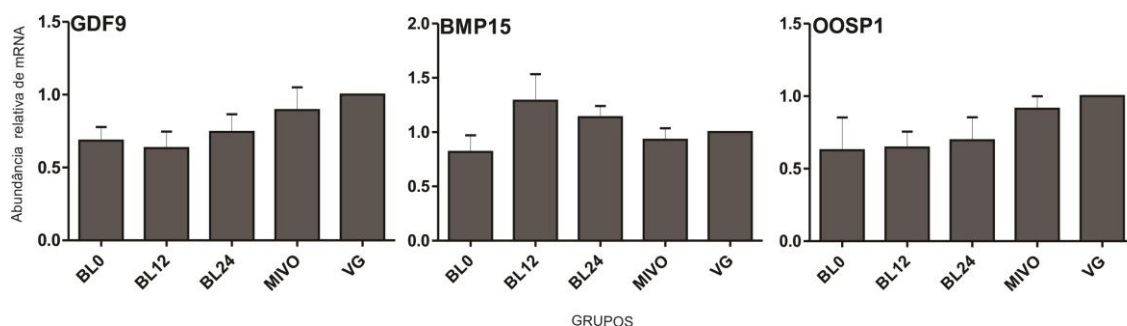


**Figura 2** – Comparação entre os níveis de transcritos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vitro* na ausência (BL0) ou presença de bloqueio meiótico com BLI (BL12, 12 h de bloqueio da meiose e MIV; BL24, 24 h de bloqueio da meiose e MIV) e oócitos imaturos (VG).

Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

### 3.3 Efeito da pré-maturação em butilolactona I na expressão gênica nos oócitos

Não houve diferença na expressão gênica de GDF9, BMP15 e OOSP1 nos oócitos entre os grupos experimentais (Figura 3).



**Figura 3** - Comparação entre os níveis de transcritos de GDF9, BMP15 e OOSP1 nos oócitos maturados *in vitro* na ausência (BL0) ou presença de bloqueio meiótico com BLI (BL12, 12 h de bloqueio da meiose e MIV; BL24, 24 h de bloqueio da meiose e MIV) e oócitos maturados *in vivo* (MIVO) ou oócitos imaturos (VG).

Médias com letras diferentes nas barras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

## 4. Discussão

No presente estudo, a pré-maturação com BLI, para o bloqueio meiótico dos oócitos, alterou a expressão gênica nas células dos cumulus de genes relacionados à competência oocitária, com influência do tempo de bloqueio e reversão. Leal et al.

(2012) observaram que, as CC de oócitos inibidos seguiram o mesmo padrão de expressão em relação ao perfil de maturação, porém foram afetadas pela inibição temporária da meiose no oócito quando as mesmas fases de maturação foram comparadas entre os grupos controle e inibidos. Além disso, os resultados de expressão gênica nos oócitos são similares ao encontrado no presente estudo, de modo que a inibição do recomeço da meiose antes da maturação resultou, praticamente, no mesmo padrão de transcrição observado no grupo controle.

Tem sido relatado que o GREM1 pode estar associado ao grau qualidade do embrião (McKenzie et al., 2004; Pangas et al., 2004; Gebhardt et al., 2011a). No entanto, a relação entre a qualidade do oócito e a expressão de GREM1 ainda não está bem definida (Cillo et al., 2007). O GREM1 é um antagonista da sinalização da proteína morfogênica do osso (BMP), regulada pelo GDF9 (McKenzie et al., 2004). Dados recentes indicam seu envolvimento na via de sinalização intrafolicular de BMP que contribui para a regulação negativa da produção de andrógenos nas células da teca (Cillo et al., 2007). A regulação diferencial de BMP através de GREM1 pode contribuir simultaneamente para a luteinização das células da granulosa e expansão das células cumulus e, portanto, influenciou na maturação final do oócito (Pangas et al., 2004). Se assim for, a expressão contínua de GREM1 nas células do cumulus pode indicar um oócito maduro e, desta forma, inferir um melhor desenvolvimento do embrião (McKenzie et al., 2004). Portanto, a maior abundância de GREM1 nas CC de oócitos maturados *in vivo* sugere uma regulação satisfatória de GDF9 e BMP no processo de maturação, assim como, a inibição meiótica por 12 horas anteriormente à MIV propiciou uma regulação positiva de GREM1.

O gene PTGS2 codifica a enzima COX2, a qual está envolvida na síntese de prostaglandinas; sua expressão nas CC está relacionada com o tempo de maturação e a

qualidade dos oócitos (Gebhardt et al., 2011b). Portanto, sua maior expressão nas CC de oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, após bloqueio da meiose por 24 horas, pode estar associada com maior tempo de maturação. A prostaglandina E possui efeitos similares ao LH nas CC, atuando na ativação das células da granulosa e no processo de ovulação, ao induzir a síntese de fatores de crescimento da família do EGF, via AMPc/PKA e MAPK (Nuttinck et al., 2011).

Os genes VCAN, HAS2 e PTX3 têm sido relacionados com a formação da matriz extracelular e desenvolvimento da competência oócitaria (Salustri et al., 2004; Adriaenssens et al., 2011). O PTX3 não interage diretamente com o ácido hialurônico (HA), mas se liga à proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TNFAIP6) e, assim, pode formar complexos multimoleculares que podem se ligar à cadeia do HA (Salustri et al., 2004). O bloqueio meiótico dos oócitos, seguido de maturação *in vitro*, ambas por 24 horas, aumentou a transcrição de PTX3 nas CC. Observou-se, ainda, que a inibição meiótica diminuiu a transcrição de VCAN nas CC, porém, a quantidade relativa de transcritos foi similar àquele das CC de oócitos maturado *in vivo*. Além disso, as CC dos oócitos não inibidos e com bloqueio por 12 horas apresentaram maior expressão de HAS2 do que o grupo maturado *in vivo* e imaturo. Entretanto, o perfil da expressão de genes relacionados com a expansão e mucificação das células do cumulus mostrou-se variável entre as condições de maturação investigadas.

A PFKP está relacionada à atividade glicolítica nas CC e mostrou correlação positiva com a gestação (Sugiura et al., 2007; Gebhardt et al., 2011b). Somente nas CC dos oócitos maturados *in vivo* a expressão gênica de PFKP foi maior do que aquela ocorrida nos oócitos imaturos. A interação metabólica entre as CC e oócito é necessária para a produção de energia a partir das células da granulosa (Sugiura et al., 2005). Sugiura et al. (2007) observaram que o LH promoveu o aumento da atividade glicolítica

nas CC de oócitos bovinos, mas não nas CC que foram previamente removidas do oócito, sugerindo que fatores secretados pelo oócitos regulam a glicólise nas CC, após o aumento do LH (Sugiura et al., 2007). Assim, o ambiente *in vivo* favorece a interação entre oócito e as CC, fornecendo uma condição para o metabolismo mais apropriada do que aquela proporcionada *in vitro* com ou sem a inibição meiótica. Além disso, no presente estudo, verificou-se uma influência do tempo do bloqueio meiótico (12 horas) e da maturação dos oócitos (12 horas) na expressão gênica de PFKP nas CC, visto que, a quantidade relativa do mRNA foi menor do que o grupo controle *in vitro*.

A AREG e EREG são membros da família de fatores de crescimento semelhante ao EGF (Romero e Smitz, 2009; Prochazka et al., 2011), sendo considerados como reguladores chave da ovulação e expansão das CC (Romero e Smitz, 2009). Neste estudo, foi observado que a MIV após o bloqueio da meiose por 12 e 24 horas, levou à uma maior expressão gênica de AREG e EREG nas CC, respectivamente. A expressão de gene da família de fatores de crescimento semelhante ao EGF pode desencadear mudanças que sinalizam a retomada da meiose (Conti et al., 2006), sendo importantes efetores da ação do LH na indução da maturação do oócito no folículo (Romero e Smitz, 2009) e da indicação de maior qualidade do oócito maturo (Zamah et al., 2010).

O grupo BL12 propiciou uma menor expressão de ADAM17 do que o grupo BL24; o resultado de expressão de ADAM10 nas CC foi similar ao grupo de oócitos imaturos. A ADAM10 é considerada como a principal protease de EGF e betacelulina, e a ADAM17 para o EREG, TGF $\alpha$ , AREG e do fator de crescimento semelhante ao EGF, ligado à heparina (Sahin et al., 2004). Dessa forma, as enzimas proteolíticas da família ADAM são responsáveis pela clivagem de moléculas com afinidade ao receptor de EGF, produzindo ligantes solúveis, os quais estimulam os receptores de forma autócrina e Parácrina (Higashiyama et al., 2008).

As CC de oócitos maturados *in vivo* exibiram uma expressão gênica similar de VCAN, HAS2, ADAM10 e ADAM17 nas CC em comparação com os oócitos imaturos. Além disso, foi observada menor expressão do gene ADAM10 e ADAM17 em comparação ao grupo controle *in vitro*, podendo ser decorrente da condição natural no folículo, por uma influência da superovulação, devido ao tempo de recuperação do oócito, após a aplicação do GNRH.

O GDF9, BMP15 e OOSP1 são fatores secretados pelo oócito, com papel essencial no desenvolvimento da foliculogênese, ovulação, fertilização e desenvolvimento do embrião (Caixeta et al., 2009). Não foi constatada diferença estatística na quantidade de transcritos para GDF9, BMP15 e OOSP1 entre os oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, e imaturos. Li et al. (2008a) e Kathirvel et al. (2013) observaram em porcas e búfalas, respectivamente, que o gene GDF9 foi expresso em maior quantidade em oócitos imaturos, declinando durante o processo de maturação, diferentemente, o BMP15 aumentou no período de 12-18 horas de maturação, decaindo após esse período. A maior abundância relativa de transcritos em oócitos imaturos pode ser atribuída ao fato de que após a retomada a meiose, os oócitos têm a cromatina condensada e conseqüentemente ocorre uma diminuição na transcrição (Tomek et al., 2002).

A menor transcrição de GREM1 e PFKP nas CC de oócitos maturados *in vitro* é influenciada pelo ambiente, o qual é menos eficiente em comparação com a maturação *in vivo* (Rizos et al., 2002). O bloqueio meiótico alterou significativamente a expressão dos genes nas CC relacionado ao metabolismo glicolítico e cascata do ácido araquidônico, bem como a formação da matrix extracelular e os fatores pertencentes à família EGF e sua atividade de clivagem. *In vitro*, observa-se uma quantidade relativa superior de mRNA em diferentes tempos de pré-maturação e maturação. Portanto, o

tempo de bloqueio da meiose e reversão influenciou diretamente a quantidade de transcritos de nas CC. Concluindo, a pré-maturação com BLI antes da maturação *in vitro* melhoraram a qualidade dos oócitos maturados, visto que favoreceu a transcrição de GREM1, AREG e PTX3 nas células do cumulus de genes associados à competência oocitária. No entanto, mais estudos com bloqueio meiótico em oócitos devem ser realizados para investigar mais profundamente a ação de determinados genes sobre a funcionalidade do oócito.

### Referências bibliográficas

- Adona, P.R., Pires, P.R., Quetglas, M.D., Schwarz, K.R., Leal, C.L., 2008. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Animal reproduction science* 108, 49-65.
- Adriaenssens, T., Segers, I., Wathlet, S., Smits, J., 2011. The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. *Journal of assisted reproduction and genetics* 28, 31-40.
- Barnes, F.L., First, N.L., 1991. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. *Molecular reproduction and development* 29, 117-123.
- Caixeta, E.S., Ripamonte, P., Franco, M.M., Junior, J.B., Dode, M.A., 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, fertility, and development* 21, 655-664.
- Cillo, F., Brevini, T.A., Antonini, S., Paffoni, A., Ragni, G., Gandolfi, F., 2007. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 134, 645-650.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y., Su, Y.Q., 2006. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715-723.
- Gardner, D.K., 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell biology international* 18, 1163-1179.
- Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russel, D.L., 2011a. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and Sterility* 96, 42-52.
- Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russell, D.L., 2011b. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and sterility* 96, 47-52 e42.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T., 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal reproduction science* 82-83, 431-446.
- Gilchrist, R.B.; Albuz, F.K.; Thompson, J.G., 2010. A new approach to *in vitro* maturation (IVM) and embryo *in vitro* production: induced IVM substantially

- improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Reproduction, Fertility and Development* 22, 293-293.
- Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67, 6-15.
- Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H., Matsushita, N., 2008. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer science* 99, 214-220.
- Kathirvel, M., Soundian, E., Kumanan, V., 2013. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 (GDF9) and Bone morphogenetic factor15 (BMP15) mRNA transcripts during maturation of buffalo (*bubalus bubalis*) cumulus-oocyte complexes. *SpringerPlus* 2, 206.
- Kotsuji, F., Kubo, M., Tominaga, T., 1994. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility* 100, 151-156.
- Kubelka, M., Motlik, J., Schultz, R.M., Pavlok, A., 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. *Biology of reproduction* 62, 292-302.
- Krisher, R.L., Bavister, B.D., 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49, 103-114.
- Leal, C.L., Mamo, S., Fair, T., Lonergan, P., 2012. Gene expression in bovine oocytes and cumulus cells after meiotic inhibition with the cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone I. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 47, 615-624.
- Li, H.K., Kuo, T.Y., Yang, H.S., Chen, L.R., Li, S.S., Huang, H.W., 2008a. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Animal reproduction science* 103, 312-322.
- McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., Matzuk, M.M., 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 19, 2869-2874.
- Nuttinck, F., Gall, L., Ruffini, S., Laffont, L., Clement, L., Reinaud, P., Adenot, P., Grimard, B., Charpigny, G., Marquant-Le Guienne, B., 2011. PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. *Biology of reproduction* 84, 1248-1257.
- Pangas, S.A., Jorgez, C.J., Matzuk, M.M., 2004. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *The Journal of biological chemistry* 279, 32281-32286.
- Prochazka, R., Petlach, M., Nagyova, E., Nemcova, L., 2011. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction* 141, 425-435.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development* 61, 234-248.

- Romero, S., Smitz, J., 2009. Epiregulin can effectively mature isolated cumulus-oocyte complexes, but fails as a substitute for the hCG/epidermal growth factor stimulus on cultured follicles. *Reproduction* 137, 997-1005.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C.P., 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology* 164, 769-779.
- Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., Doni, A., Bastone, A., Mantovani, G., Beck Peccoz, P., Salvatori, G., Mahoney, D.J., Day, A.J., Siracusa, G., Romani, L., Mantovani, A., 2004. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 131, 1577-1586.
- Sugiura, K., Pendola, F.L., Eppig, J.J., 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental biology* 279, 20-30.
- Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J., 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 134, 2593-2603.
- Tomek, W., Torner, H., Kanitz, W., 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 37, 86-91.
- Yurttas, P., Morency, E., Coonrod, S.A., 2010. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction* 139, 809-823.
- Zamah, A.M., Hsieh, M., Chen, J., Vigne, J.L., Rosen, M.P., Cedars, M.I., Conti, M., 2010. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 25, 2569-2578.
- Vignerot, C., Perreau, C., Dalbès-Tran, R., Joly, C., Humblot, P., Uzbekova, S., Mermillod, P., 2004. Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Molecular reproduction and development* 69, 457-465.

*Considerações finais*

### Considerações finais

Ainda que o emprego de meio quimicamente definido seja ideal para a padronização da PIV de embriões em suas diferentes etapas, a suplementação de SFB no meio de MIV favoreceu a expressão gênica de GREM1 e AREG nas CC, em comparação ao uso de BSA ou PVA. A adição de EGF no meio de MIV aumentou a expressão gênica de EREG nas CC, bem como, a realização da pré-maturação com butirólactona I antes da MIV proporcionou o aumento na transcrição de GREM1, AREG e PTX3, resultando na melhora da qualidade da maturação oocitária. No entanto, a maior abundância de transcritos de mRNA nas CC de oócitos maturados *in vivo* indica a necessidade de estabelecimento de meios e/ou condições de MIV mais eficientes para melhorar a competência oocitária.

*Anexos*

1 **Trabalho a ser enviado para a revista *Animal Reproduction Science***

2

3 **Quantification of mRNA in oocytes and cumulus cells of immature oocytes and**  
4 **oocytes grown *in vivo* or in an *in vitro* maturation medium supplemented with**  
5 **different macromolecules**

6

7

8 Diego Gouvêa de Souza<sup>a</sup>, Fernanda Nunes Marqui<sup>a</sup>, Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli<sup>c</sup>,  
9 Andressa Vilas Boas Nogueira<sup>c</sup>, Alicio Martins Jr.<sup>b</sup>, Eunice Oba<sup>a</sup>.

10

11 *University of São Paulo State, UNESP, College of Veterinary Medicine and Animal*  
12 *Science, <sup>a</sup>Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Botucatu-SP,*  
13 *18618-000, Brazil, <sup>b</sup>Department of Clinical Surgery and Animal Reproduction,*  
14 *Araçatuba-SP, 16050-680, Brazil and <sup>c</sup>University of São Paulo State, UNESP,*  
15 *Department of Diagnosis and Surgery, Arararaquara-SP, 14801-903, Brazil*

16 Author contact information: phone +55 16 997814512, email [diego.souza@uol.com.br](mailto:diego.souza@uol.com.br)

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30 **ABSTRACT**

31           When chemically defined media are used, fetal calf serum (FCS) and bovine  
32 serum albumin (BSA) are often replaced by synthetic macromolecules, such as  
33 polyvinyl alcohol (PVA). However, the rate of formation of viable blastocysts using  
34 these media is smaller. The objective of this study was to quantify the gene transcripts  
35 GDF9, BMP15 and OOSP1 in oocytes and GREM1, PTGS2, PFKP, AREG, EREG,  
36 HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 and ADAM17 in cumulus cells (CC) from immature  
37 oocytes (germinal vesicle state, GV), *in vivo* matured oocytes (IVMO), or oocytes  
38 grown in *in vitro* maturation (IVM) medium supplemented with 10% FCS plus 4  
39 mg/mL of BSA or 1 mg/mL of PVA. For the IVMO, 10 donors were subjected to  
40 superovulation with follicle-stimulating hormone (FSH), and the cumulus-oocyte  
41 complexes (COC) were obtained by ovum pick-up (OPU) 19-20 h after gonadorelin  
42 administration. The relative amounts of the gene transcripts GREM1, PTGS2, PFKP  
43 and AREG were higher ( $P<0.05$ ) in the CC of IVMO compared to those in the GV or  
44 IVM oocytes. Higher transcription ( $P<0.05$ ) of GREM1 and AREG was observed in the  
45 CC of oocytes grown in IVM medium with FCS. Therefore, it was concluded that the  
46 addition of FCS to the IVM medium positively affected the gene transcription of  
47 GREM1 and AREG compared to the addition of BSA or PVA. However, the higher  
48 expression in the CC of IVMO indicates the need for research aimed at the  
49 establishment of more efficient IVM medium and/or conditions to increase oocyte  
50 competence.

51

52 Keywords: gene expression, oocyte competence, IVM, FCS, BSA, PVA.

53

54

55

56 **1. Introduction**

57 The lack of reliable indicators of oocyte developmental competence and the low  
58 rate of *in vitro* maturation (IVM) success continue to present obstacles to *in vitro*  
59 production (IVP) of bovine embryos.

60 Under *in vivo* conditions, oocyte maturation is an induced process, whereby the  
61 meiotic arrest mediated by cyclic 3',5' adenosine monophosphate (c-AMP) is overcome  
62 by a wave of gonadotropin before ovulation (Gilchrist et al., 2010). In comparison to *in*  
63 *vivo* matured oocytes, which are in the process of acquiring competence for  
64 development, *in vitro* matured oocytes undergo premature maturation, and the  
65 molecular cascade that restarts meiosis differs entirely from the one that occurs *in vivo*  
66 (Gilchrist and Thompson, 2007). Thus, some oocytes resume meiosis without acquiring  
67 full competence, and therefore, the *in vitro* development rate of bovine oocytes to the  
68 blastocyst stage is limited to approximately 30 to 40% (Rizos et al., 2002).

69 The acquisition of competence by oocytes is affected by endocrine, paracrine  
70 and autocrine factors, occurs during oogenesis and follicular development, and is  
71 important in culture systems (Li et al., 2008). IVM is intrinsically limited to the  
72 development of the oocyte, indicating that there are molecular and biochemical  
73 alterations that allow the matured oocyte to be normally fertilized and to become an  
74 embryo (Gilchrist and Thompson, 2007). During this phase, mitochondria synthesize  
75 the ATP required for protein synthesis during maturation and subsequent embryonic  
76 development (Krisher and Bavister, 1998). The transcription and storage of a large  
77 amount of material in oocytes do not have a selective role in oogenesis but are also  
78 important for the regulation of embryogenesis (Yurttas et al., 2010), just as the  
79 transcriptional activation of the embryonic genome is required for development beyond  
80 the maternal/zygotic transition stage (Barnes and First, 1991).

81 Cumulus cells (CC) provide nutrients and regulatory signals to oocytes,  
82 facilitating the progression of maturation, in particular nuclear maturation. However,  
83 factors secreted by the oocyte allow differentiation of CC from mural granulosa cells, in  
84 addition to their mucification (Gilchrist et al., 2004). Several critical genes for the  
85 development of oocytes are expressed in CC and are under the control of maternal and  
86 oocyte signals; these genes represent the maturation state (Gebhardt et al., 2011a).

87 The complete removal of serum from culture protocols has been challenging  
88 (Watson et al., 2000). The protein sources most used as supplements in media for IVP  
89 of bovine embryos are fetal calf serum (FCS) and bovine serum albumin (BSA)  
90 (Mingoti et al., 2002). However, sources of animal origin may carry agents that are  
91 infectious and toxic to the embryo (Gardner, 1994), in addition to having undefined  
92 compounds that, when used for embryo culture, alter the relative abundance of  
93 transcripts (Rizos et al., 2002). When chemically defined media are used (Keskin-tepe et  
94 al., 1995), FCS and BSA are replaced by synthetic macromolecules, such as polyvinyl  
95 alcohol (PVA) or polyvinylpyrrolidone (PVP). However, the use of chemically defined  
96 media yields lower viable blastocyst formation rates (Korhonen et al., 2010).

97 The objective of this study was to quantify transcripts with great potential for  
98 marking competence in oocytes (BMP15, GDF9 and OOSP1) and CC (GREM1,  
99 PTGS2, PFKP, AREG, EREG, HAS2, VCAN, PTX3, ADAM10 and ADAM17) from  
100 immature oocytes, *in vivo* matured oocytes, or oocytes cultured in IVM medium with  
101 different macromolecules (FCS, BSA or PVA). We hypothesize that in medium  
102 containing FCS, oocytes and CC of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes will exhibit a  
103 higher abundance of transcripts for gene markers of oocyte competence compared to  
104 immature oocytes.

105

## 106 **2. Materials and Methods**

107 Unless specified, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis,  
108 MO, USA).

### 109 *2.1 Experimental groups*

110 Five treatment groups were designed, namely, oocytes at the germinal vesicle  
111 stage (GV), oocytes grown in IVM medium with 10% FCS (FCS), oocytes grown in  
112 IVM medium with 4 mg/mL of BSA (BSA), oocytes grown in IVM medium with 1  
113 mg/mL of PVA (PVA) and *in vivo* matured oocytes (IVMO).

114

### 115 *2.2. IVM*

116 Cow ovaries were collected from animals slaughtered at a slaughterhouse, at a  
117 maximum of 30 min *post-mortem*. The samples were transported in a thermos  
118 containing a physiological solution at a temperature of 31 to 33°C. Follicles that were 2-  
119 7 mm in diameter were aspirated using an 18 G needle and a 10-mL syringe. The  
120 follicular fluid was placed in a 15-mL centrifuge tube and was maintained at 37°C for  
121 sedimentation of the cumulus-oocyte complexes (COC).

122 Next, COC with homogeneous cytoplasm and at least three to four layers of CC  
123 were washed three times and selected in PBS with 10% FCS (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas,  
124 Brazil). After selection, groups of 25 oocytes were transferred to 100-μL drops of IVM  
125 medium dispersed on a Petri dish (60 x 10 mm) under mineral oil. The maturation  
126 medium was composed of medium 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2.2 mg/mL of  
127 sodium bicarbonate, 22 μg/mL of sodium pyruvate, 50 μg/mL of gentamicin sulfate, 1  
128 μg/mL of FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canada), 5 μg/mL of luteinizing hormone

129 (LH) (Lutropin<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canada), 1 µg/mL of estradiol (Sigma Co., St. Louis,  
130 USA), 0.10 mM cysteamine (Sigma Co., St. Louis, USA) and 10% FCS, 4 mg/mL of  
131 BSA or 1 mg/mL of PVA. The IVM was performed in an incubator (Forma Scientific,  
132 USA) under a humid atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> and 38.8°C for 24 hours.

### 133 2.3 IVMO

134 *In vivo* matured COC were obtained by ovum pick-up (OPU) from 10 Nelore  
135 donors, previously synchronized (D0) with a progesterone intravaginal device (Primer<sup>®</sup>,  
136 Tecnopec, Brazil) and 2 mg of estradiol benzoate (Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, Brazil). At  
137 days 4, 5 and 6, the animals received 180 mg of FSH, in six decreasing doses, wherein  
138 at D6, 0.53 mg of sodium cloprostenol (Ciosin<sup>®</sup>, MSD, Brazil) was administered. At  
139 D7, the intravaginal device was removed, and the OPU was performed 19 to 20 hours  
140 after the administration of 2.5 mg of gonadorelin (Fertagyl<sup>®</sup>, Intervet, Brazil). The COC  
141 with homogeneous cytoplasm and expanded CC were stored at -80°C for subsequent  
142 analysis of gene expression.

### 143 2.4 Gene expression analysis

144 CC were removed by repeated pipetting in PBS with 0.1% hyaluronidase. Drops  
145 containing only the CC were centrifuged (3.355 x g/10 min) for sediment formation,  
146 and then, naked oocytes and cumulus cell sediment were frozen, separately, in 350 µL  
147 of total RNA extraction medium and stored at -80°C for subsequent gene expression  
148 analysis.

149 RNA extraction was performed using the RNeasy Micro kit (Qiagen - Hilden,  
150 Germany) and was quantified in a micro-volume spectrophotometer (NanoVue, GE  
151 Healthcare), considering the ratio A260/A280 of between 1.8 and 2.1 to be indicative of  
152 purity of the RNA obtained. After purification, the RNA samples were eluted in 30 µL

153 of RNase-free water. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using a High  
154 Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), according to the  
155 manufacturer's instructions. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was  
156 performed with SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix reagents (Applied Biosystems); the  
157 reactions were performed at a final volume of 20  $\mu$ L, with gene amplification at  
158 95°C/10 min and denaturation at 95°C/15 s followed by annealing for 1 min (40 cycles).  
159 The primer sequences, fragment size and annealing temperature for each gene are  
160 presented in Table 1.

161 The transcript data of the target genes were normalized to the expression of the  
162 constitutive gene GAPDH. This reaction was conducted in a StepOne thermocycler  
163 (Applied Biosystems), and the results were analyzed using the  $\Delta$  method ( $\Delta$ Ct) with the  
164 thermocycler software for relative quantification of the expression of target genes, after  
165 normalization with the constitutive gene.

## 166 *2.5 Statistical analysis*

167 Data regarding the gene expression of the oocytes and CC were analyzed with  
168 ANOVA, and the difference between the means was determined by Tukey's test;  
169  $P < 0.05$  was considered significant. The results are presented as the mean  $\pm$  standard  
170 error of the mean.

171

## 172 **3. Results**

173 *3.1 Comparison of the gene expression of CC of oocytes matured in vitro with different*  
174 *macromolecules and in vivo matured oocytes.*

175 The expression results of the genes GREM1, PTGS2, PFKP, VCAN, HAS2,  
176 AREG, EREG, PTX3, ADAM10 and ADAM17 in CC are described in Figure 1. The  
177 relative abundances of GREM1 and AREG, PTGS2 and PFKP mRNA were higher  
178 ( $P<0.05$ ) in the CC of *in vivo* matured oocytes compared to those of immature oocytes  
179 or *in vitro* matured oocytes. *In vivo* matured oocytes exhibited transcription of VCAN,  
180 HAS2, ADAM10 and ADAM17 in the CC similar to that in immature oocytes, with *in*  
181 *vitro* matured oocytes producing more transcripts ( $P<0.05$ ) of these genes in comparison  
182 to the CC of immature oocytes. However, the CC of oocytes matured in medium  
183 containing FCS exhibited a greater relative amount of ADAM10 transcripts compared  
184 to the *in vivo* matured group. There was no significant difference ( $P>0.05$ ) between the  
185 *in vitro* and the *in vivo* matured groups for the genes VCAN, HAS2, EREG, PTX3 and  
186 ADAM17. A difference ( $P<0.05$ ) in the abundance of VCAN, HAS2, EREG, PTX3,  
187 ADAM10 and ADAM17 transcripts was observed between the CC of *in vitro* matured  
188 oocytes and the CC of immature oocytes, whereas EREG and PTX3 were also  
189 expressed in higher amounts ( $P<0.05$ ) in the CC of *in vivo* matured oocytes compared to  
190 the CC of immature oocytes.

191 Among the groups grown *in vitro*, there was a higher relative mRNA abundance  
192 ( $P<0.05$ ) of GREM1 and AREG in the CC of oocytes grown in IVM medium with FCS  
193 (Figure 2). However, there was no difference between the groups matured *in vitro* for  
194 the genes PFKP, PTGS2, VCAN, HAS2, EREG, PTX3, ADAM10 and ADAM17. In  
195 contrast, these groups exhibited a larger ( $P<0.05$ ) number of transcripts in the CC of  
196 immature oocytes, except for the gene PTGS2 in oocytes grown in IVM medium with  
197 PVA (Figure 2).

198

199

200 3.2 Effect of different macromolecules on gene expression in oocytes

201           There was no difference in the gene expression of GDF9, BMP15 and OOSP1  
202 among oocytes matured *in vitro* in medium containing FCS, BSA or PVA, IVMO and  
203 GV oocytes (Figure 3).

204

#### 205 **4. Discussion**

206           IVM is a critical step in the oocyte competence acquisition process for  
207 subsequent development to the blastocyst stage. Thus, the maturation medium plays a  
208 vital role in establishing a highly favorable environment for the oocyte to acquire the  
209 conditions to be fertilized and, consequently, continue embryonic development.  
210 Therefore, the establishment of the maturation media and/or more efficient conditions to  
211 induce complete oocyte competence has been essential for the subsequent achievement  
212 of better results with IVP. Thus, the assessment of gene expression is an important tool  
213 to analyze oocyte quality under different *in vitro* or *in vivo* conditions.

214           The relationship between oocyte quality and the expression of GREM1 is not yet  
215 clear (Cillo et al., 2007). However, it has been suggested that the GREM1 gene may be  
216 associated with the degree of embryo quality (Pangas et al., 2004; McKenzie et al.,  
217 2004; Gebhardt et al., 2011a). The GREM1 is an antagonist of bone morphogenic  
218 protein (BMP) signaling, which is regulated by GDF9 (McKenzie et al., 2004). Recent  
219 data suggest its involvement in the BMP intrafollicular signaling pathway, which  
220 contributes to the negative regulation of androgen production in theca cells (Cillo et al.,  
221 2007). Differential regulation of BMP by GREM1 may contribute simultaneously to the  
222 luteinization of granulosa cells and expansion of CC and, therefore, to the final  
223 maturation of oocytes (Pangas et al., 2004). If so, the continuous expression of GREM1  
224 in CC may indicate a mature oocyte and, thus, better predict embryo development

225 (McKenzie et al., 2004). Therefore, the greater abundance of GREM1 in the CC of *in*  
226 *vivo* matured oocytes suggests an appropriate regulation of GDF9 and BMP in the  
227 maturation process, while greater *in vitro* expression in the CC of oocytes grown in  
228 IVM medium with FCS may indicate a direct effect and/or interaction of factors  
229 introduced into the medium by the serum, which could have a beneficial effect on  
230 oocyte competence. Velho et al. (2013) found that the use of FCS in IVM medium  
231 increased the abundance of transcripts in the CC but did not interfere with oocyte  
232 nuclear maturation.

233         AREG and EREG are members of the EGF-like growth factor family (Romero  
234 and Smitz, 2009; Prochazka et al., 2011) and are considered key regulators of ovulation  
235 and CC expansion (Romero and Smitz, 2009). In the present study, higher AREG  
236 transcription was observed in the CC of *in vivo* matured oocytes. The expression of this  
237 gene can trigger changes that signal the resumption of meiosis (Conti et al., 2006), in  
238 addition to effectively influencing the quality of the oocyte (Zamah et al., 2010).  
239 Compared to BSA and PVA, FCS addition to the IVM medium increased the abundance  
240 of AREG. However, there is no information in the literature regarding the influence of  
241 FCS in IVM medium on the transcription of AREG and GREM1 in the CC, although  
242 Córdova et al. (2011) and Velho et al. (2013) observed that IVM medium  
243 supplementation with FCS generally results in increased transcription of several genes  
244 in the CC compared to BSA or PVA.

245         The CC of *in vivo* matured oocytes exhibited higher relative abundances of  
246 PTGS2 and PFKP compared to immature oocytes and *in vitro* matured oocytes.  
247 Córdova et al. (2011) observed a higher abundance of PTGS2 in the CC of oocytes  
248 matured in medium containing FCS compared to medium containing PVA. In the  
249 present study, the CC of oocytes matured in medium containing PVA exhibited similar

250 amounts of PTGS2 as immature oocytes, indicating an inferior maturation condition  
251 compared to those induced by FCS and BSA. This observation is most likely due to the  
252 absence of components that can interact with the cells, thereby exhibiting a surfactant  
253 property, which prevents adhesion of the COC to plastic and glass surfaces and to each  
254 other. The PTGS2 gene codes for the COX2 enzyme, which is involved in the synthesis  
255 of prostaglandins; its expression in the CC is related to the time of maturation and  
256 quality of oocytes (Gebhardt et al., 2011b). Prostaglandin E has effects similar to LH on  
257 CC, acting in the activation of granulosa cells and in the ovulation process by inducing  
258 the synthesis of growth factors of the EGF family via AMPc/PKA and MAPK (Nuttinck  
259 et al., 2011). The PFKP gene is related to the glycolytic activity in CC (Sugiura et al.,  
260 2007; Gebhardt et al., 2011b). The metabolic interaction between the CC and the oocyte  
261 is necessary for the production of energy from granulosa cells (Sugiura et al., 2005).  
262 The LH promotes the increase of glycolytic activity in the CC of bovine oocytes but not  
263 in the CC that were previously removed from the oocyte, suggesting that factors  
264 secreted by oocytes regulate glycolysis in the CC after the increase of LH (Sugiura et  
265 al., 2007).

266 In general, the CC of *in vitro* matured oocytes exhibited higher relative  
267 abundance of transcripts for the genes GREM1, PTGS2, PFKP, VCAN, AREG, EREG,  
268 HAS2, PTX3, ADAM10 and ADAM17, wherein GREM1, PTGS2, PFKP, AREG,  
269 EREG and PTX3 were more highly expressed in the CC of *in vivo* matured oocytes  
270 compared to the CC of immature oocytes, indicating an important role of these genes in  
271 the *in vitro* and *in vivo* maturation processes. However, the CC of *in vivo* matured  
272 oocytes exhibited similar gene expression for VCAN, HAS2, ADAM10 and ADAM17  
273 compared to immature oocytes and a lower expression of the gene ADAM10 compared  
274 to the CC of oocytes matured *in vitro* in IVM medium with FCS; this finding may be a

275 the natural condition in the follicle or through the influence of superovulation and the  
276 time of oocyte recovery after the application of GNRH. The genes VCAN, HAS2 and  
277 PTX3 have been related to the formation of the extracellular matrix and development of  
278 oocyte competence (Salustri et al., 2004; Adriaenssens et al., 2011). ADAM10 emerged  
279 as the main protease for EGF and betacellulin, and ADAM17 is the main protease for  
280 EREG, TGF $\alpha$ , AREG and the heparin-binding EGF-like growth factor (Sahin et al.,  
281 2004). Many of these actions are essential for LH action, including cumulus expansion,  
282 oocyte maturation and ovulation (Li et al., 2009).

283 GDF9, BMP15 and OOSP1 are factors secreted by the oocyte, and they have an  
284 essential role in folliculogenesis, ovulation, fertilization and embryo development  
285 (Caixeta et al., 2009). In the present study, no significant difference was observed in the  
286 amount of GDF9, BMP15 and OOSP1 transcripts in the CC of immature and *in vitro* or  
287 *in vivo* matured oocytes. Li et al. (2008a) and Kathirvel et al. (2013) observed that in  
288 pigs and buffalo, respectively, the gene GDF9 was more expressed in immature oocytes  
289 and declined over the process of maturation; in contrast, BMP15 was higher in the 12-  
290 18-hour period of maturation and decreased thereafter. The greater relative abundance  
291 of immature oocytes may be attributed to the fact that after the oocytes resume meiosis,  
292 they are in a state of condensed chromatin and, therefore, decrease transcription (Tomek  
293 et al., 2002).

294 The lower transcription of GREM1, PTGS2, PFKP and AREG in the CC of *in*  
295 *vitro* matured oocytes is influenced by the environment, which is less efficient than  
296 IVMO (Rizos et al., 2002). *In vitro*, FCS resulted in a higher abundance of transcripts in  
297 the CC, most likely due to the presence of several components; these include growth  
298 factors such as FGF and IGF, which have great mitogenic power in different cell types  
299 (Zheng et al., 2006), including granulosa cells (Lorenzo et al., 1994), in addition to

300 being able to suppress apoptosis (Zhandi et al., 2009) and contributing to the regulation  
301 of follicular development and the maturation of oocytes (Zhang et al., 2010). Thus, it is  
302 concluded that although the use of chemically defined media for the standardization of  
303 IVP of embryos is ideal, the addition of FCS in IVM medium positively influenced  
304 GREM1 and AREG gene transcription in the CC. However, the higher abundance of  
305 transcripts in the CC of *in vivo* matured oocytes indicates the need for research aimed at  
306 the establishment of more efficient media and/or IVM conditions to improve oocyte  
307 competence.

308

## 309 **References**

310

- 311 Adriaenssens, T., Segers, I., Wathlet, S., Smits, J., 2011. The cumulus cell gene  
312 expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for  
313 blastocyst formation. *Journal of assisted reproduction and genetics* 28, 31-40.
- 314 Barnes, F.L., First, N.L., 1991. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine  
315 embryos. *Molecular reproduction and development* 29, 117-123.
- 316 Caixeta, E.S., Ripamonte, P., Franco, M.M., Junior, J.B., Dode, M.A., 2009. Effect of  
317 follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an  
318 approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction,*  
319 *fertility, and development* 21, 655-664.
- 320 Cillo, F., Brevini, T.A., Antonini, S., Paffoni, A., Ragni, G., Gandolfi, F., 2007.  
321 Association between human oocyte developmental competence and expression  
322 levels of some cumulus genes. *Reproduction* 134, 645-650.
- 323 Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y., Su, Y.Q., 2006. Role of the epidermal growth factor  
324 network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715-723.
- 325 Cordova, B., Morato, R., de Frutos, C., Bermejo-Alvarez, P., Paramio, T., Gutierrez-  
326 Adan, A., Mogas, T., 2011. Effect of leptin during *in vitro* maturation of  
327 prepubertal calf oocytes: embryonic development and relative mRNA abundances  
328 of genes involved in apoptosis and oocyte competence. *Theriogenology* 76, 1706-  
329 1715.
- 330 Gardner, D.K., 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic  
331 cell support. *Cell biology international* 18, 1163-1179.
- 332 Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russel, D.L., 2011a. Human  
333 cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single  
334 embryo transfer. *Fertility and Sterility* 96, 42-52.
- 335 Gebhardt, K.M., Feil, D.K., Dunning, K.R., Lane, M., Russell, D.L., 2011b. Human  
336 cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single  
337 embryo transfer. *Fertility and sterility* 96, 47-52 e42.
- 338 Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T., 2004. Oocyte-somatic cell interactions  
339 during follicle development in mammals. *Animal reproduction science* 82-83,  
340 431-446.

- 341 Gilchrist, R.B.; Albuz, F.K.; Thompson, J.G., 2010. A new approach to *in vitro*  
342 maturation (IVM) and embryo *in vitro* production: induced IVM substantially  
343 improves embryo yield and pregnancy outcomes.  
344 *Reproduction, Fertility and Development* 22 , 293-293.
- 345 Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and  
346 technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 67, 6-  
347 15.
- 348 Kathirvel, M., Soundian, E., Kumanan, V., 2013. Differential expression dynamics of  
349 Growth differentiation factor9 ( ) and Bone morphogenetic factor15 ( ) mRNA  
350 transcripts during maturation of buffalo ( ) cumulus-oocyte complexes.  
351 *SpringerPlus* 2, 206.
- 352 Keskinetepe, L., Burnley, C.A., Brackett, B.G., 1995. Production of viable bovine  
353 blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biology of reproduction* 52, 1410-1417.
- 354 Korhonen, K., Kananen, K., Ketoja, E., Matomaki, J., Halmekyto, M., Peippo, J., 2010.  
355 Effects of serum-free *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo  
356 development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts.  
357 *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 45, 42-49.
- 358 Krisher, R.L., Bavister, B.D., 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture  
359 environment. *Theriogenology* 49, 103-114.
- 360 Li, H.K., Kuo, T.Y., Yang, H.S., Chen, L.R., Li, S.S., Huang, H.W., 2008a. Differential  
361 gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation  
362 factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos. *Animal*  
363 *reproduction science* 103, 312-322.
- 364 Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.J., Smith, G.W., 2009. Gene expression profiling  
365 of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent  
366 up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction*  
367 137, 297-307.
- 368 Li, Q., McKenzie, L.J., Matzuk, M.M., 2008b. Revisiting oocyte-somatic cell  
369 interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte  
370 developmental competence. *Molecular human reproduction* 14, 673-678.
- 371 Lorenzo, P.L., Illera, M.J., Illera, J.C., Illera, M., 1994. Enhancement of cumulus  
372 expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the  
373 addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of*  
374 *reproduction and fertility* 101, 697-701.
- 375 McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E.,  
376 Amato, P., Matzuk, M.M., 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression:  
377 a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum*  
378 *Reprod* 19, 2869-2874.
- 379 Mingoti, G.Z., Garcia, J.M., Rosa-e-Silva, A.A., 2002. Steroidogenesis in cumulus cells  
380 of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different  
381 concentrations of steroids. *Animal reproduction science* 69, 175-186.
- 382 Nuttinck, F., Gall, L., Ruffini, S., Laffont, L., Clement, L., Reinaud, P., Adenot, P.,  
383 Grimard, B., Charpigny, G., Marquant-Le Guienne, B., 2011. PTGS2-related  
384 PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle:  
385 late effects on early embryonic development. *Biology of reproduction* 84, 1248-  
386 1257.
- 387 Pangas, S.A., Jorgez, C.J., Matzuk, M.M., 2004. Growth differentiation factor 9  
388 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *The*  
389 *Journal of biological chemistry* 279, 32281-32286.

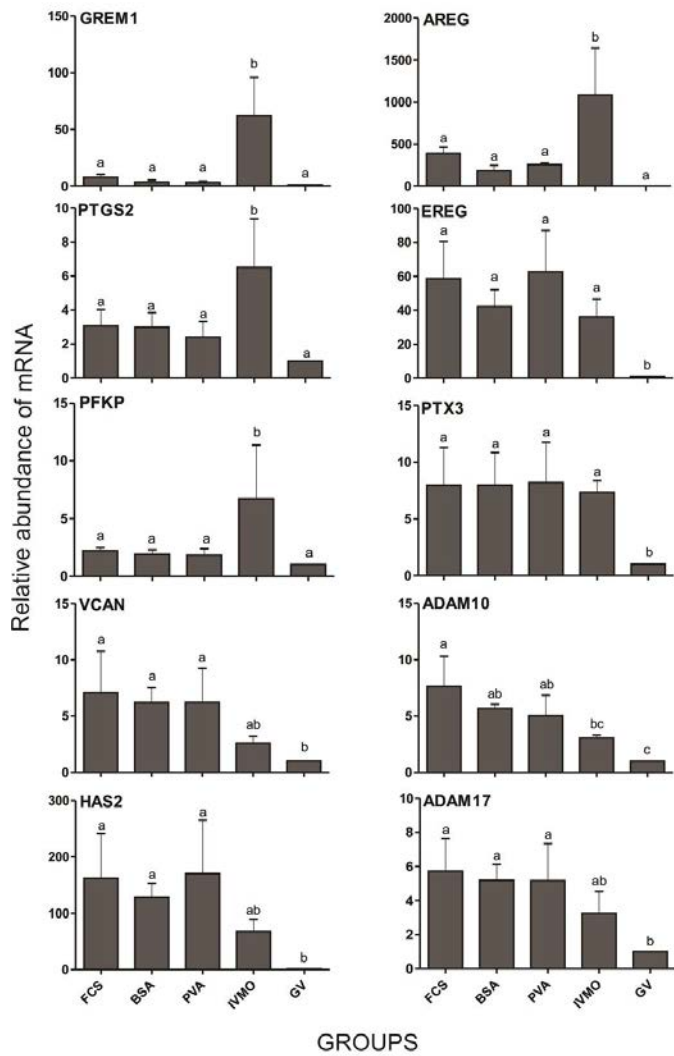
- 390 Prochazka, R., Petlach, M., Nagyova, E., Nemcova, L., 2011. Effect of epidermal  
391 growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and  
392 acquisition of developmental competence in vitro: comparison with  
393 gonadotropins. *Reproduction* 141, 425-435.
- 394 Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. Consequences of  
395 bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro  
396 versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular  
397 reproduction and development* 61, 234-248.
- 398 Romero, S., Smitz, J., 2009. Epiregulin can effectively mature isolated cumulus-oocyte  
399 complexes, but fails as a substitute for the hCG/epidermal growth factor stimulus  
400 on cultured follicles. *Reproduction* 137, 997-1005.
- 401 Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.M., Higashiyama, S., Peschon, J.,  
402 Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C.P., 2004. Distinct roles for ADAM10 and  
403 ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell  
404 biology* 164, 769-779.
- 405 Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., Doni,  
406 A., Bastone, A., Mantovani, G., Beck Peccoz, P., Salvatori, G., Mahoney, D.J.,  
407 Day, A.J., Siracusa, G., Romani, L., Mantovani, A., 2004. PTX3 plays a key role  
408 in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo  
409 fertilization. *Development* 131, 1577-1586.
- 410 Sugiura, K., Pendola, F.L., Eppig, J.J., 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity  
411 between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism.  
412 *Developmental biology* 279, 20-30.
- 413 Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien,  
414 M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J., 2007. Oocyte-derived BMP15 and  
415 FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 134, 2593-  
416 2603.
- 417 Tomek, W., Torner, H., Kanitz, W., 2002. Comparative analysis of protein synthesis,  
418 transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of  
419 bovine oocytes in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 37, 86-  
420 91.
- 421 Velho, F.A.B., Costa, B.G., Alcoba, D.D., Braga, B.L.R., Monroy, N.L.S., Oliveira,  
422 A.T.D., Lopes, R.F.F., 2013. Gene Expression and In Vitro Nuclear Maturation in  
423 Bovine Cumulus Oocyte Complexes Matured in a Medium Supplemented with  
424 Bovine Fetal Serum or Bovine Serum Albumin. *Acta Scientiae Veterinariae* 41,  
425 1156.
- 426 Watson, A.J., De Sousa, P., Caveney, A., Barcroft, L.C., Natale, D., Urquhart, J.,  
427 Westhusin, M.E., 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte  
428 transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of  
429 reproduction* 62, 355-364.
- 430 Yurttas, P., Morency, E., Coonrod, S.A., 2010. Use of proteomics to identify highly  
431 abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction*  
432 139, 809-823.
- 433 Zamah, A.M., Hsieh, M., Chen, J., Vigne, J.L., Rosen, M.P., Cedars, M.I., Conti, M.,  
434 2010. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of  
435 the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 25,  
436 2569-2578.
- 437 Zhandi, M., Towhidi, A., Nasr-Esfahani, M.H., Eftekhari-Yazdi, P., Zare-Shahneh, A.,  
438 2009. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine

439 oocyte developmental competence under heat stress. Journal of assisted  
 440 reproduction and genetics 26, 605-611.  
 441 Zhang, K., Hansen, P.J., Ealy, A.D., 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine  
 442 oocyte maturation and developmental competence in vitro. Reproduction 140,  
 443 815-826.  
 444 Zheng, X., Baker, H., Hancock, W.S., Fawaz, F., McCaman, M., Pungor, E., Jr., 2006.  
 445 Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a  
 446 raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the  
 447 manufacture of biological drugs. Biotechnology progress 22, 1294-1300.

448  
 449  
 450 **Table 1** – Primer sequences, structure analyzed, amplified fragment size (bp) and  
 451 annealing temperature.  
 452  
 453

Genes	Sequences	Structure analyzed	Amplified fragment size (bp)	Annealing temperature (° C)
GAPDH	F 5'- GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA -3' R 5'- CCCTCCACGATGCCAAAGT -3'	Oocytes/Cumulus	119	62
GDF9	F 5'- TGGTCCTTGCTGAAGCATCTAGA -3' R 5'- ACAGTGTGTAGAGGTGGCTTCT -3'	Oocytes	202	59
BMP15	F 5'- GTCAGCAGCCAAGAGGTAGTG -3' R 5'- CCCGAGGACATACTCCCTTAC -3'	Oocytes	360	59
OOSP1	F 5'- GCCAAGATTAACCCACACTATTT -3' R 5'- ATAATGAGCATCTGGTGAAACGTA -3'	Oocytes	182	56
GREM1	F 5'- GTCACACTCAACTGCCCTGA -3' R 5'- GCACACGAACTACGCACAAG -3'	Cumulus	251	57
PTGS2	F 5'- AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA -3' R 5'- TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT -3'	Cumulus	168	60
PFKP	F 5'- TCAGAGAACCGTGCCTGGAAGAAA -3' R 5'- TGACCACAAGCTCCTTGATCTGCT -3'	Cumulus	112	59
AREG	F 5'- CTTTCGTCCTGCCATGACCTT -3' R 5'- CGTTCCTCAGCGACACCTTCA -3'	Cumulus	100	60
EREG	F 5'- ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA -3' R 5'- TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT -3'	Cumulus	100	60
HAS2	F 5'- ACACAGACAGGCTGAGGACAACTT -3' R 5'- AAGCAGCTGTGATTCCAAGGAGGA -3'	Cumulus	133	60
VCAN	F 5'- GCACCTGTGTGCCAGGATA -3' R 5'- CAGGGATTAGAGTGACATTCATCA -3'	Cumulus	70	60
PTX3	F 5'- CCTCAGCTATCGGTCCATAA -3' R 5'- ATTGAAGCCTGTGAGGTCTGC -3'	Cumulus	294	54
ADAM10	F 5'- ACCCCCCAAAGTCTCTCACA -3' R 5'- AATCATGCGGAGATCCAAAGTT -3'	Cumulus	210	60
ADAM17	F 5'- TGGGATGTGAAGATGTGCTAGA -3' R 5'- ATCCAAGTGTCCCATATCAAAATC -3'	Cumulus	105	60

454



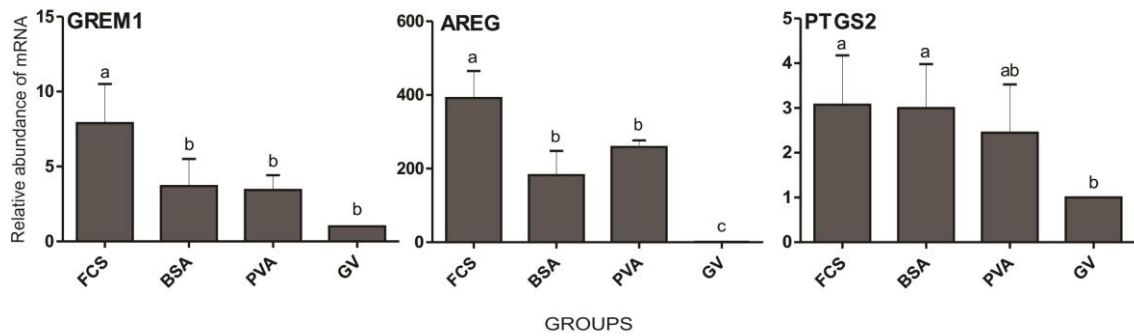
455

456 **Figure 1** – Comparison of transcript abundance in the cumulus cells of *in vitro* matured  
 457 oocytes in medium containing FCS, BSA or PVA, *in vivo* matured oocytes (IVMO) and  
 458 immature oocytes (GV).

459 <sup>a-c</sup> Different letters above the bars indicate significant differences (P<0.05).

460

461



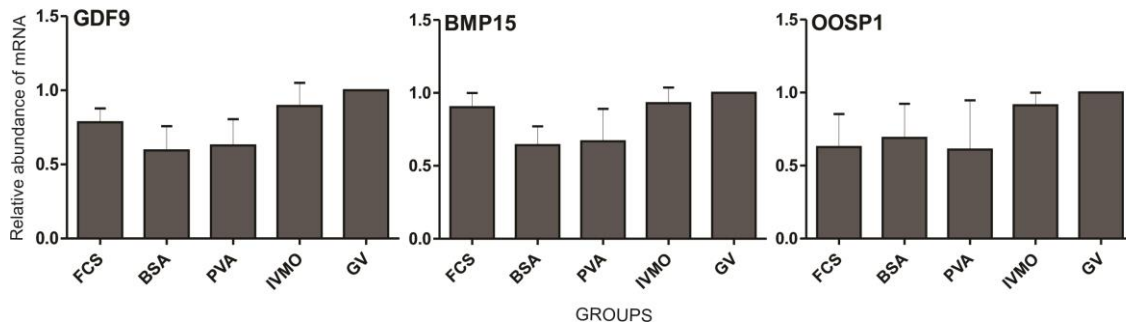
462

463 **Figure 2** – Comparison of the abundance of GREM1, AREG and PTGS2 transcripts in  
464 the cumulus cells of *in vitro* matured oocytes in medium containing FCS, BSA or PVA  
465 and immature oocytes (GV).

466 <sup>a-c</sup> Different letters above the bars indicate significant differences (P<0.05).

467

468



469

470 **Figure 3** - Relative abundance of GDF9, BMP15 and OOSP1 transcripts among oocytes  
471 matured *in vitro* in medium containing FCS, BSA or PVA, IVMO and GV oocytes.

472 <sup>a-c</sup> Different letters above the bars indicate significant differences (P<0.05).

473



# ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF CONTENTS

---

ISSN: 0378-4320

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.3</b>

### DESCRIPTION

---

*Animal Reproduction Science* publishes original research and timely reviews on topics relating to **reproduction** and **fertility** in **animals**. This includes both fundamental research and applied studies, including management practices that increase our understanding of the **biology** and **manipulation** of reproduction. The focus is on animals that are useful to humans including food- and fibre-producing; companion/recreational; captive; and endangered species including zoo animals, but excluding laboratory animals unless the study reveals new information that impacts our basic understanding of the biology or manipulation of reproduction applicable to the animals listed above.

The journal's scope includes the study of reproductive physiology and endocrinology, reproductive cycles, natural and artificial control of reproduction, preservation and use of gametes and embryos, pregnancy and parturition, infertility and sterility, diagnostic and therapeutic techniques.

*Animal Reproduction Science* has decided not to publish papers that exclusively examine the *in vitro* development of oocytes and embryos; however, it will consider papers that include *in vitro* studies where the source of the oocytes and/or development of the embryos beyond the blastocyst stage is part of the experimental design.

Authors with any concerns are encouraged to contact the journal to enquire about the suitability of the content of their paper for [submission](#). *Animal Reproduction Science* has no page charges and only publishes papers after rigorous peer review.

### AUDIENCE

---

Research Workers in Animal and Human Reproduction, Animal Health Workers.

### IMPACT FACTOR

---

2013: 1.581 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Animal Breeding Abstracts  
Bibliography of Reproduction  
Elsevier BIOBASE  
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
MEDLINE®  
PubMed  
Biological Abstracts  
Current Awareness in Biological Sciences  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Co-Editors-in-Chief*

**A.C.O. Evans**, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland  
**P.J. Hansen**, University of Florida, Gainesville, FL, USA  
**G.N. Hinch**, University of New England, Armidale, NSW, Australia  
**J.E. Kinder**, Ohio State University, Wooster, OH, USA

### *Reviews Editor*

**K.L. Macmillan**, University of Melbourne, Veterinary Clinical Centre, Werribee, VIC, Australia

### *Editorial Advisory Board*

**B.M. Alexander**, Laramie, WY USA  
**L.L. Anderson**, Ames, IA USA  
**C. Aurich**, Vienna, Austria  
**F.W. Bazer**, College Station, TX USA  
**P.J. Broadbent**, Aberdeen, Scotland, UK  
**H. Cardenas**, Columbus, OH USA  
**J.F. Cavalieri**, Townsville, QLD, Australia  
**D. Cavestany**, Montevideo, Uruguay  
**P. Comizzoli**, Washington, DC USA  
**R.A. Cushman**, Clay Center, NE USA  
**R.A. Dailey**, Morgantown, WV USA  
**S.P. de Graaf**, Sydney, NSW, Australia  
**J.A. Delgadillo**, Torreón, Coahuila, Mexico  
**M.G. Diskin**, Athenry, County Galway, Ireland  
**M-A. Driancourt**, Beaucauzé, France  
**A.D. Ealy**, Gainesville, FL USA  
**W.L. Flowers**, Raleigh, NC USA  
**J. Ford**, Maryville, MO, USA  
**D.L. Garner**, Reno, NV USA  
**C.L. Gasser**, Cedar City, UT USA  
**W.V Holt**, London, UK  
**K. Imakawa**, Tokyo, Japan  
**A.L. Johnson**, University Park, PA USA  
**R.J. Mapletoft**, Saskatoon, SK, Canada  
**J.F. Mee**, Fermoy, County Cork, Ireland  
**J.C.F. Moraes**, Bage, Brazil  
**T. Nagai**, Taipei, Taiwan, China  
**N. Parvizi**, Neustadt, Germany  
**J.R. Pursley**, East Lansing, MI USA  
**J.P. Ravindra**, Bangalore, India  
**R.R. Santos**, Utrecht, Netherlands  
**D.C. Sharp**, Gainesville, FL USA  
**Y-L. Shiue**, Kaohsiung, Taiwan  
**J.F. Smith**, Auckland, New Zealand  
**D.L. Thompson**, Baton Rouge, LA USA  
**A. Turner**, Burwood, VIC Australia  
**S. Uzbekova**, Nouzilly, France

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### *Types of Paper*

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

*Original Research Papers* should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review Articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan  
University of Melbourne  
Veterinary Clinical Centre  
250 Princess Highway  
VIC 3030 Werribee, Australia  
k.macmillan@unimelb.edu.au

#### *Contact details for submission*

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### *Human and animal rights*

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

#### *Conflict of interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

#### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere

in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

#### *For subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *For open access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anirep>.

### Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## PREPARATION

### Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

#### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

#### Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### Results

Results should be clear and concise.

#### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

## Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

## Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

## Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## Artwork

### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

## **AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/89/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/). You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>



## TABLE OF CONTENTS

---

ISSN: 1871-1413

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>

## DESCRIPTION

---

*Livestock Science* promotes the sound development of the **livestock sector** by publishing original, peer-reviewed research and review articles covering all aspects of this broad field. The journal welcomes [submissions](#) on the avant-garde areas of **animal genetics, breeding, growth, reproduction, nutrition, physiology, and behaviour** in addition to **genetic resources, welfare, ethics, health, management and production systems**. The high-quality content of this journal reflects the truly international nature of this broad area of research.

### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

## AUDIENCE

---

Animal Scientists, Animal Breeders.

## IMPACT FACTOR

---

2013: 1.100 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

AGRICOLA  
Agris  
BIOBASE  
BIOSIS  
BioBusiness  
Current Contents Search  
EBSCOhost  
FSTA (Food Science and Technology Abstracts)  
SCISEARCH  
UnCover  
Web of Science  
CAB Abstracts  
CSA Database  
Inside Conferences  
Scopus  
Science Citation Index Expanded  
Global Health  
Foodline: Food Science and Technology

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**J.E. Hermansen**, Aarhus Universitet, Foulum, Denmark

### *Honorary Editor-in-Chief*

**J.G. Boyazoglu**, Menton, France

### *Section Editors*

#### ***Genetics, Animal Genetic Resources and Breeding***

**B. Ducro**, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands  
**J.B.S. Ferraz**, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, Sp, Brazil  
**F. Goyache**, SERIDA (Deva), Gijon, Spain  
**J. Windig**, Livestock Research Wageningen UR, Wageningen, Netherlands

#### ***Ruminant Nutrition***

**E.R. Orskov**, Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, UK  
**K-H. Südekum**, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, Germany  
**M.R. Weisbjerg**, Aarhus Universitet, Tjele, Denmark  
**G. Zervas**, Athens, Greece

#### ***Non-Ruminant Nutrition***

**L.I. Chiba**, Auburn University, Auburn, AL, USA  
**J.E. Lindberg**, Sveriges Lantbruks Universitet (SLU), Uppsala, Sweden  
**E.G. Manzanilla**, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

#### ***Behaviour, Health and Welfare***

**D. Maes**, Universiteit Gent, Merelbeke, Belgium  
**J.N. Marchant-Forde**, Purdue University, West Lafayette, IN, USA  
**S. Waiblinger**, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria

#### ***Livestock Farming Systems and Management***

**K. Galanopoulos**, Democritus University of Thrace, Orestiada, Greece

#### ***Physiology***

**E. Albrecht**, Leibniz-Institut für Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany  
**I. Louveau**, INRA, Saint-Gilles, France

#### ***Reproduction Physiology***

**S. T. Butler**, Teagasc, Fermoy, Co. Cork, Ireland  
**P. Humblot**, Sveriges Lantbruks Universitet (SLU), Uppsala, Sweden

### **Editorial Advisory Board**

**J.F. Aguilera**, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain  
**J. Balcells**, Universitat de Lleida, Lleida, Spain  
**P. Bosi**, Università di Bologna, Bologna, Italy  
**J. Cañon**, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain  
**I. Curik**, University of Zagreb, Zagreb, Croatia  
**A. De Vries**, University of Florida, Gainesville, FL, USA  
**M'N. Djemali**, United Arab Emirates (UAE) University, Al-Ein, United Arab Emirates  
**M. Dominguez**, New York University (NYU) School of Medicine, San Juan, Puerto Rico  
**M.A. Elzo**, University of Florida, Gainesville, FL, USA  
**J.C.P. Ferreira**, University of Sao Paulo State (UNESP), Botucatu/SP, Brazil  
**L. Fiems**, Institute for Agricultural & Fisheries Research (ILVO), Melle, Belgium  
**A. Gibon**, INRA Centre de Toulouse, Castanet#Tolosan, France  
**F. Gondret**, INRA Centre de Rennes, Saint Gilles, France  
**A.J. Heinrichs**, Pennsylvania State University, University Park, PA, USA  
**J-F. Hocquette**, INRA de Clermont-Ferrand/Theix, Saint-Genès-Champanelle, France  
**P. Huhtanen**, Sveriges Lantbruks Universitet (SLU), Uppsala, Sweden  
**F. Infascelli**, University of Naples Federico II, Naples, Italy  
**L. Istasse**, Université de Liège, Liege, Belgium  
**M. Kaps**, University of Zagreb, Zagreb, Croatia  
**A.G. Kongsted**, Aarhus Universitet, Tjele, Denmark  
**A.R. Kristensen**, Københavns Universitet, Frederiksberg, Denmark  
**T. Kristensen**, Aarhus Universitet, Tjele, Denmark  
**P. Lund**, Aarhus Universitet, Tjele, Denmark  
**N. Lundeheim**, Sveriges Lantbruks Universitet (SLU), Uppsala, Sweden  
**N.P.P. Macciotta**, University of Sassari, Sassari, Italy  
**M. MacNeil**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Miles City, MT, USA  
**J.I. McNitt**, Southern University Agricultural Research and Extension Center, Baton Rouge, LA, USA  
**Q. Meng**, China Agricultural University, Beijing, P.R. China  
**R. Mosenthin**, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany  
**J. Sanders**, Texas A&M University, College Station, TX, USA  
**V. Santé-Lhoutellier**, INRA, Qualité des Produits Animaux, Saint Genès Champanelle, France  
**A.L. Schaefer**, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Lacombe, AB, Canada  
**A.A. Sosnicki**, PIC North America, Hendersonville, TN, USA  
**D. Spiers**, University of Missouri, Columbia, MO, USA  
**A.J. van der Zijpp**, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands  
**D.M. Weary**, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada  
**W. Weiss**, Ohio State University, Wooster, OH, USA

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### *Types of article*

1. Original Research Articles (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Position Papers
5. Technical Notes
6. Book Reviews

*Original Research Articles* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. They should not occupy more than 12 Journal pages.

*Review Articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. Reviews will often be invited, but submitted reviews will also be considered for publication. All reviews will be subject to the same peer review process as applies for original papers. They should not occupy more than 12 Journal pages.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications may be submitted to the journal as such, or may result from a request to condense a regular paper, during the peer review process. They should not occupy more than 5 journal pages (approximately 10 manuscript pages) including figures, tables and references.

*Position Papers* are informative and thought-provoking articles on key issues, often dealing with matters of public concern. These will usually be invited, but a submitted paper may also be considered for publication. They should not occupy more than 12 Journal pages.

A *Technical Note* is a report on a new method, technique or procedure falling within the scope of *Livestock Science*. It may involve a new algorithm, computer program (e.g. for statistical analysis or for simulation), or testing method for example. The Technical Note should be used for information that cannot adequately be incorporated into an Original Research Article, but that is of sufficient value to be brought to the attention of the readers of *Livestock Science*. The note should describe the nature of the new method, technique or procedure and clarify how it differs from those currently in use if cannot be incorporated. They should not occupy more than 5 Journal pages.

*Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old.

#### *Contact details for submission*

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### *Human and animal rights*

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Livestock Science*.

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

#### *For subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *For open access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.  
Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

## **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

## **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/livsci/>

## **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **Article structure**

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasise part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title should be clear, descriptive and not too long
- Abstract
- Keywords (indexing terms)
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, and so on
- References
- Figure captions
- Figures (separate file(s))
- Tables (separate file(s))

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not be longer than 400 words.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>.

Isotope numbers should precede the symbols, e.g. <sup>18</sup>O.

The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

## Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

## References

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

### Reference style

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

## Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### AFTER ACCEPTANCE

#### Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

#### Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

### **AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/89/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/). You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>