

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MODULAÇÃO DO EGFR EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS
BOVINOS CULTIVADOS *in vitro* E SEUS EFEITOS SOBRE O
METABOLISMO, MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA
OOCITÁRIA E A TRANSCRIÇÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DO
CUMULUS E DOS EMBRIÕES**

**Priscila Chediek Dall’ Acqua
Médica Veterinária**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MODULAÇÃO DO EGFR EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS
BOVINOS CULTIVADOS *in vitro* E SEUS EFEITOS SOBRE O
METABOLISMO, MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA
OOCITÁRIA E A TRANSCRIÇÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DO
CUMULUS E DOS EMBRIÕES**

**Discente: Priscila Chediek Dall’ Acqua
Orientadora: Dra. Gisele Zoccal Mingoti**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrária e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária, área de Reprodução
Animal**

2018

D144m

Dall'Acqua, Priscila Chediek

Modulação do EGFR em complexos cumulus-oócitos
bovinos cultivados in vitro e seus efeitos sobre o metabolismo,
maturação e aquisição da competência oocitária e a transcrição
gênica das células do cumulus e dos embriões / Priscila
Chediek Dall'Acqua. -- Jaboticabal, 2018
135 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti

1. lipídios. 2. embriologia. 3. maturação in vitro. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

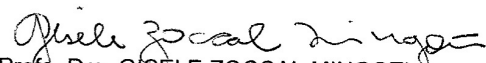
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MODULAÇÃO DO EGFR EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS BOVINOS CULTIVADOS *in vitro* E SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO, MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA E A TRANSCRIÇÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DO CUMULUS E DOS EMBRIÕES

AUTORA: PRISCILA CHEDIEK DALL' ACQUA

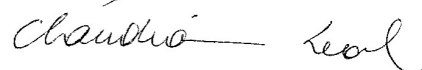
ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

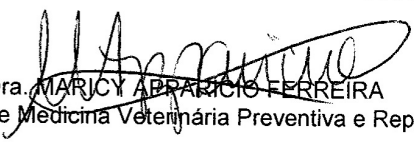
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA/UNESP - Araçatuba


Prof. Dr. FELIPE PERECIN
Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP


Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL
Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP


Profa. Dra. MARICY APARECIDO FERREIRA
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 27 de agosto de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Priscila Chediek Dall'Acqua – nascida em Araraquara-SP, aos 22 dias do mês de Julho de 1989. Concluiu o ensino médio no *Collegium Sapiens*, na cidade de Araraquara-SP, em dezembro de 2006. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, Câmpus Luiz Meneghel, na cidade de Bandeirantes-PR, em março de 2008. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2012. Coursou Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, de março de 2013 à fevereiro de 2015, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa da Capes. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Doutorado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2015, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, obteve bolsa da Capes.

EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicaste à tua
rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

DEDICO

Dedico este trabalho à minha mãe
pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À professora Gisele Mingoti, pela confiança, orientação e inspiração para seguir o caminho da pesquisa e da docência.

À toda minha família pelo apoio constante. Especialmente minha mãe, meus padrinhos, minha tia Denise e meu primo-irmão Thiago.

Às minhas amigas, Giovana Nunes, Beatriz Leão, Nathália Rocha-Frigoni, Melissa Meneghel e Luana Rodrigues que acompanharam de perto e de uma forma ou de outra auxiliaram na realização deste trabalho.

Às estagiárias que acompanharam e participaram de alguma parte deste trabalho: Cíntia Rodrigues, Maria Isabela Azeredo e Luana Rillo. E à Juliana Viegas que esteve sempre torcendo por mim.

Ao funcionário Alexandre Teixeira pelo auxílio na manutenção do laboratório, por estar sempre presente, pelos pães de queijo e patês, pelo carinho e por sempre cuidar de mim e dar meninas.

Ao funcionário Adão Custódio pela atenção e por providenciar o material para a realização do experimento.

À todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Fisiologia da Reprodução (#labfisiorep).

Aos meus amigos da pós-graduação Thiago Grassi, Erivelto Junior e Leandro Garcia pelo apoio e incentivo constante.

Aos amigos de sempre, Marina Cervato, Bruna Bombarda, Luciana Barrancos, Bruno Faglioni e Vitor Rossi, pelo apoio e pela amizade de longa data.

Ao professor Marcelo Nogueira e à Patrícia Fontes pela colaboração.

À professora Flávia Lopes e seus alunos pelo auxílio nas análises.

Às professoras Lindsay Gimenes e Maricy Apparício pelas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Aos professores Felipe Perecin, Cláudia Leal, Maricy Apparício e Maria Emília Oliveira por aceitarem participar da banca examinadora e pelas contribuições.

À Capes pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche.

À toda a equipe do RedBiolab da Universidade de Milão, em especial ao professor Alberto Luciano e à professora Valentina Lodde por me receberem tão

bem e por estarem sempre dispostos a ensinar e compartilhar suas experiências. À Federica Franciosi pelos ensinamentos. À Laura Terzaghi pela ajuda diária nos experimentos, pelo companheirismo e pelo passeio do *canyoning*. À Cecilia Dieci por compartilhar suas experiências e pela companhia no abatedouro.

À FCAV-Unesp pela oportunidade de realizar o doutorado e à FMVA-Unesp pela disponibilização das instalações para a realização do experimento.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
 CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	 1
1 Introdução.....	1
2 Revisão de literatura.....	3
2.1 Desenvolvimento oocitário.....	3
2.2 Maturação oocitária.....	5
2.2.1 Maturação nuclear.....	5
2.2.2 Maturação citoplasmática.....	7
2.3 Papel do EGFR na maturação oocitária.....	8
2.4 Modulação do bloqueio meiótico.....	10
3 Referências.....	12
 CAPÍTULO 2 – A modulação da sinalização do receptor do fator de crescimento epidermal durante a pré-maturação altera a cinética do remodelamento da cromatina e o perfil de transcritos de complexos cumulus-oócito bovinos.....	 22
Resumo.....	22
1 Introdução.....	23
2 Material e métodos.....	26
2.1 Obtenção e seleção de COC.....	26
2.2 Pré-maturação e MIV.....	26
2.3 Avaliação da configuração da cromatina, sua cinética e da distribuição dos microfilamentos de actina.....	 28
2.4 Quantificação do conteúdo lipídico intraoocitário.....	29
2.5 Avaliação da expansão das células do cumulus.....	29
2.6 Avaliação da funcionalidade das junções gap.....	30
2.7 Extração do RNA e transcrição reversa.....	30

2.8 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	31
2.9 Análise estatística.....	34
3 Resultados.....	35
3.1 Maturação nuclear.....	35
3.2 Expansão das células do cumulus.....	38
3.3 Funcionalidade das junções <i>gap</i>	38
3.4 Distribuição dos microfilamentos.....	39
3.5 Quantificação de lipídios com Nile Red.....	40
3.6 Abundância relativa de transcritos nas células do cumulus.....	42
4 Discussão.....	50
5 Referências.....	55

CAPÍTULO 3 – Differences in embryonic gene expression and quality indicate the benefit of epidermal growth factor receptor inhibitor during prematuration to improve competence in bovine oocytes.....64

1 Title page.....	64
2 Abstract	65
3 Introduction.....	66
4 Materials and Methods.....	68
COC collection and selection.....	68
Prematuration and IVM.....	69
In vitro embryo production.....	69
Assessment of apoptosis.....	70
Quantification of intracellular lipid content.....	70
RNA extraction and messenger RNA reverse transcription.....	71
Gene expression analysis by RT-qPCR	71
Statistical analysis.....	73
5 Results.....	73
Prematuration with EGFR inhibitor do not affect oocyte competence for the production of bovine embryos.....	73
<i>Apoptosis index is decreased in blastocysts produced from oocytes prematured with EGFR inhibitor.....</i>	<i>74</i>

Intracellular lipid content is not altered in blastocysts produced from oocytes prematured with EGFR inhibitor.....	74
<i>Prematuration with EGFR alters the relative transcript abundance in blastocysts</i>	74
Functional analysis of differentially expressed genes.....	75
6 Discussion.....	75
7 Declaration of interest.....	80
8 Funding.....	80
9 Acknowledgements.....	80
10 References.....	80
11 Figure legends.....	89
12 Tables.....	91
13 Figures.....	97



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12354/15 do trabalho de pesquisa intitulado “**Modulação do bloqueio meiótico sob diferentes condições de transporte de complexos *Cumulus-oócitos* bovinos e seus efeitos na produção *in vitro* de embriões**”, sob a responsabilidade da Dr^a Gisele Zoccal Mingoti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

Prof^a Dr^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Modulação do bloqueio meiótico sob diferentes condições de transporte de complexos *Cumulus*-oócitos bovinos e seus efeitos na produção *in vitro* de embriões", sob orientação da Prof.^a Dr.^a Gisele Zoccal Mingoti e Certificado CEUA protocolo nº 12354/15, aprovado em reunião ordinária em 06 de julho de 2015, teve o título alterado para "**Modulação do EGFR em complexos cumulus-oócitos bovinos cultivados *in vitro* e seus efeitos sobre o metabolismo, maturação e aquisição de competência oocitária e a transcrição gênica das células do cumulus e dos embriões**" aprovado em reunião ordinária de 08 de março de 2018.

Jaboticabal, 08 de março de 2018.



Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski

Coordenadora – CEUA

MODULAÇÃO DO EGFR EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO* E SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO, MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA E A TRANSCRIÇÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DO CUMULUS E DOS EMBRIÕES

RESUMO – O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) está relacionado com a retomada da meiose induzida por estímulo gonadotrófico. Nós utilizamos um inibidor do EGFR (AG1478) para inibir a retomada da meiose durante a pré-maturação (PMIV). No experimento I, foi avaliada a maturação oocitária, a expansão das células do cumulus, a funcionalidade das junções *gap*, a distribuição dos microfilamentos de actina e o conteúdo lipídico em oócitos e, a expressão gênica nas células do cumulus. No experimento II, foi avaliado o desenvolvimento embrionário, a taxa de eclosão, o número total de células, a taxa de apoptose, o conteúdo lipídico e expressão gênica nos embriões. No experimento I, os COC foram PMIV por 8h em meio com 1 μ M de AG1478, inibidor do EGFR, (EGFR-PreIVM), em seguida foram MIV por 22h (EGFR-IVM); foram feitos 4 grupos controle: oócitos imaturos imediatamente após sua remoção do folículo (Control_Immat), oócitos MIV por 8h (Control_PreIVM), por 22h (Control_IVM_22h) e por 30h (Control_IVM_30h). No experimento II, os COC foram PMIV por 8h em meio com 1 μ M do inibidor do EGFR, em seguida foram MIV por 22h (EGFR-); os COC do grupo controle foram MIV por 22h (Control). Em seguida, os oócitos foram FIV e cultivados por até 9 dias. No experimento I, o grupo EGFR-PreIVM apresentou 53,1% dos oócitos em GV, com a maioria em GV1 (42,9%; $P>0,05$) ou em GV3 [28,6%, semelhante ao grupo Control_Immat ($P>0,05$) e menor que o grupo Control_PreIVM ($P<0,05$)]; após a MIV não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) entre os grupos nas taxas de MII, mas o grupo Control_IVM_30h (9,1%) teve maiores ($P<0,05$) taxas de oócitos degenerados. A expansão das células do cumulus foi menor ($P<0,05$) no grupo EGFR-PreIVM e as junções *gap* se mantiveram funcionais ($P<0,05$). Os microfilamentos de actina não diferiram entre os grupos ($P>0,05$) e estavam em sua maioria na categoria normal. O conteúdo lipídico foi menor ($P<0,05$) no grupo EGFR-PreIVM comparado com Control_Immat, mas após a MIV foi maior ($P<0,05$) no grupo EGFR-IVM do que no Control_IVM. Diferenças na expressão dos genes de maturação oocitária, expansão das células do cumulus, metabolismo, metabolismo lipídico, qualidade e desenvolvimento embrionário, regulação epigenética, estresse do retículo endoplasmático, defesa antioxidante e apoptose foram observadas após a PMIV e; nos genes de expansão das células do cumulus, metabolismo e qualidade embrionária após a MIV. No experimento II, as taxas de blastocistos, de eclosão, o número total de células e o conteúdo lipídico não diferiram ($P>0,05$) nos embriões avaliados. A apoptose foi menor ($P<0,05$) no grupo EGFR-. Os genes *NANOG*, *RPLP0*, *H2AFZ*, *HMGCS1*, *ACSL1*, *GPAT3*, *FADS2*, *FASN*, *FDX1*, *BID*, *GPX4* e *HIF1A* foram mais expressos ($P<0,05$) no grupo EGFR-. Em conclusão o tratamento com inibidor do EGFR proporcionou bloqueio parcial da meiose com manutenção das junções *gap* funcionais, que foi relacionado com maior potencial de desenvolvimento dos oócitos, devido à redução da apoptose nos embriões e ao aumento na expressão de genes relacionados com desenvolvimento, sugerindo melhor qualidade embrionária.

Palavras-chave: conteúdo lipídico, desenvolvimento embrionário, maturação oocitária *in vitro*, sinalização do EGFR

EGFR MODULATION IN BOVINE *IN VITRO*-CULTURED CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES AND THE EFFECTS ON OOCYTE METABOLISM, MATURATION, COMPETENCE AND GENE TRANSCRIPTION IN CUMULUS CELLS AND EMBRYOS

ABSTRACT – Epidermal growth factor receptor (EGFR) is related with meiosis resumption by gonadotropic stimulus. We used an EGFR inhibitor (AG1478) to block meiosis resumption during prematuration (PIVM). In experiment I, was evaluated oocyte maturation, cumulus cells expansion, gap junctions functionality, microfilaments distribution and lipid content in oocytes and, gene expression in cumulus cells. In experiment II, was assessed embryo development, hatching rates, total cell number, apoptosis, lipid content and gene expression in embryos. For experiment I, COC were PIVM for 8h in medium supplemented with 1 μ M of AG1478, an EGFR inhibitor, (EGFR-*PreIVM*), followed by 22h IVM (EGFR-*IVM*); four control groups were evaluated: immature oocytes immediately after follicle removal (Control-*Immat*), oocytes IVM for 8h (Control-*PreIVM*), oocytes IVM for 22h (Control-*IVM_22h*) and oocytes IVM for 30h (Control-*IVM_30h*). For experiment II, COC were PIVM for 8h in medium supplemented with 1 μ M of EGFR inhibitor, followed by 22h IVM (EGFR-); COC from control group were matured for 22h (Control). After that, oocytes were IVF and zygotes were cultured up to 9 days. In experiment I, EGFR-*PreIVM* group had 53.1% of the oocytes blocked in GV, the majority in GV1 (42.9%; $P>0.05$) or in GV3 [28.6%, similar to Control-*Immat* ($P>0.05$) and lower than Control-*PreIVM* ($P<0.05$)]. After IVM, no differences ($P>0.05$) were found between groups in MII rates, but Control-*IMV_30h* (9.1%) had higher ($P<0.05$) rates of degenerated oocytes. Cumulus cells expansion was lower ($P<0.05$) in EGFR-*PreIVM* and gap junctions maintained the functionality ($P<0.05$). Actin microfilaments were mostly distributed in normal category after PIVM and after IVM, and no differences were found ($P>0.05$). Lipid content was lower ($P<0.05$) in EGFR-*PreIVM* in comparison to Control-*Immat*, but after IVM was higher ($P<0.05$) in EGFR-*IVM* than Control-*IVM*. After PIVM differences ($P>0.05$) were found in genes for oocyte maturation, cumulus cells expansion, metabolism, lipid metabolism, embryo quality, embryo development, epigenetic regulation, endoplasmic reticulum stress, antioxidant defense and apoptosis; after IVM, the differences ($P<0.05$) were in genes for cumulus cells expansion, metabolism and embryo quality. In experiment II, blastocyst, hatching rates, lipid content and cell number did not differ between treatments ($P>0.05$). Apoptosis was lower ($P<0.05$) in EGFR-. The genes *NANOG*, *RPLP0*, *H2AFZ*, *HMGCS1*, *ACSL1*, *GPAT3*, *FADS2*, *FASN*, *FDX1*, *BID*, *GPX4* and *HIF1A* were upregulated ($P<0.05$) in EGFR-. In conclusion, treatment with EGFR inhibitor lead to partial meiotic block with functional gap junctions, related to higher oocyte developmental potential, due to the lower apoptotic index and the increased expression of genes related do development, suggesting better embryo quality.

Keywords: lipid content, embryo development, oocyte in vitro maturation, EGFR signaling

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 Introdução

O processo de maturação oocitária é regulado por mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos que atuam em conjunto no folículo ovariano de forma a coordenar a interação entre as células da granulosa, o oócito e as células do cumulus ao seu redor (Sun *et al.*, 2009).

O controle da maturação oocitária é mediado por segundo mensageiros, especialmente o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), os quais são produzidos principalmente nas células do cumulus e transportados para o oócito através de junções *gap* (Shuhaibar *et al.*, 2015). No interior do oócito, o GMPc inibe a fosfodiesterase 3A (PDE3A), enzima que degrada o AMPc (Norris *et al.*, 2009; Vaccari *et al.*, 2009). Assim, as altas concentrações intraoocitárias de AMPc mantêm a inativação do fator promotor da maturação (MPF), mantendo o bloqueio meiótico (Dekel, 2005; Gilchrist, 2011).

Durante o bloqueio meiótico, a integridade da comunicação entre o oócito e as células somáticas adjacentes, via junções *gap*, é essencial para a aquisição da competência oocitária (Gilchrist *et al.*, 2016). No entanto, no momento em que os oócitos são recuperados de folículos antrais para serem utilizados em procedimentos de maturação *in vitro* (MIV), os mecanismos de controle da retomada da meiose, acima citados, são desequilibrados (Blondin *et al.*, 1997; Bilodeau-Goeseels, 2011). O fechamento precoce das junções *gap*, com consequente diminuição das concentrações intraoocitárias de AMPc, culminam na retomada da meiose, o que leva a uma menor eficiência de MIV quando comparada à que ocorre *in vivo* (Blondin *et al.*, 1997; Bilodeau-Goeseels, 2011). Desta forma, como a maioria dos oócitos ainda está em processo de aquisição de competência meiótica e de competência para ser adequadamente fertilizado e prosseguir o desenvolvimento embrionário, a capacidade dos oócitos MIV pode ser comprometida (Luciano *et al.*, 2018).

Com o intuito de melhorar a competência dos oócitos MIV, inibidores da meiose podem ser adicionados em uma etapa prévia à MIV, denominada pré-

maturação (Hendriksen *et al.*, 2000), visando modular, principalmente, as concentrações de AMPc (revisado por Gilchrist *et al.*, 2016). Para tanto, já foram utilizadas drogas inibidoras de fosfodiesterases (PDE), como a cilostamida, milrinona ou 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX), drogas ativadoras da adenilato-ciclase, como a forskolina, ou ainda drogas que aumentam o GMPc através do precursor do peptídeo natriurético do tipo C (NPPC; Melhmann, 2005; Albuz *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2014; Dieci *et al.*, 2016; Dall'Acqua *et al.*, 2017; Razza *et al.*, 2018). Porém, nenhum destes estudos demonstrou benefícios substanciais para a produção *in vitro* de embriões (PIV) com relação ao aumento da taxa de blastocistos e da qualidade dos embriões. Nesse sentido, o estudo de novas substâncias e estratégias é necessário.

A inibição do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) durante o cultivo de pré-maturação pode ser uma alternativa interessante e pouco estudada em bovinos, na tentativa de melhorar o entendimento dos fatores responsáveis pela aquisição de competência oocitária e o controle da meiose, já que a via do EGFR é responsável por modular a passagem dos nucleotídeos cíclicos para o oócito por meio das junções *gap*. Assim, o bloqueio do EGFR e, conseqüentemente, da maturação nuclear, associado ao estudo da expressão gênica das células do cumulus, pode evidenciar vias de regulação envolvidas na maturação oocitária desencadeada pelo EGFR, além de proporcionar ao oócito maior tempo para o acúmulo de transcritos, com conseqüente melhoria na aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário. Adicionalmente, o estudo da expressão gênica dos embriões derivados de oócitos pré-maturados com inibidor do EGFR poderá demonstrar se a possível melhoria da competência do oócito afeta a qualidade e o metabolismo dos embriões.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos do cultivo de complexos cumulus-oócitos bovinos por 8 horas em meio contendo AG1478, um bloqueador específico do EGFR, sobre: (1) bloqueio da meiose e sua reversibilidade; (2) expressão gênica das células do cumulus; (3) competência oocitária para o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*; (4) qualidade e (5) expressão gênica embrionária.

2 Revisão de literatura

2.1 Desenvolvimento oocitário

A meiose nas células germinativas femininas é iniciada durante a vida fetal, porém é bloqueada na fase de diplóteno da prófase I, que é caracterizada pela estrutura nuclear envolta por uma membrana, cuja configuração é denominada vesícula germinativa (GV; Dekel, 2005). A meiose permanece bloqueada em GV até que o folículo que contenha este oócito seja ativado e se desenvolva até se tornar dominante, anteriormente ao pico pré-ovulatório de gonadotrofinas (revisado por Conti e Franciosi, 2018). O folículo primordial ativado e seu oócito incluso crescem paralelamente, porém o oócito atinge seu tamanho máximo (aproximadamente 120 μm) quando o folículo atinge 3 mm de diâmetro (revisado por Fair, 2003), encerrando então sua fase de crescimento. A partir de então, o folículo continua seu crescimento e o oócito inicia sua fase de diferenciação. Nessa fase, a cromatina em GV sofre remodelação progressiva, que indica as fases de diferenciação do oócito (Luciano *et al.*, 2011; Lodde *et al.*, 2013). Em bovinos, as fases de GV progridem de GV0 à GV3, havendo um aumento progressivo da condensação da cromatina (Lodde *et al.*, 2007), que por sua vez estão relacionadas com alterações morfológicas nos compartimentos nuclear e citoplasmático e com a diminuição da atividade transcricional (Lodde *et al.*, 2007). A competência oocitária para o desenvolvimento embrionário subsequente pode ser relacionada com a categoria de GV (Luciano *et al.*, 2011; Lodde *et al.*, 2013), sendo que a competência para o desenvolvimento é maior nos oócitos em GV2 e GV3 (Lodde *et al.*, 2007). A capacidade dos oócitos em GV0 de retomar e completar a meiose é limitada, no entanto, a atividade transcricional é elevada nessa fase.

Embora oócitos em GV0 possuam níveis elevados de síntese de RNA mensageiro (RNAm), tem baixa capacidade de desenvolvimento, pois ainda estão acumulando moléculas necessárias para o posterior desenvolvimento (Lodde *et al.*, 2008). No entanto, a quantidade total de RNAm não difere entre as configurações de GV no oócito bovino (Labrecque *et al.*, 2015), provavelmente porque as células do cumulus transferem RNAm para os oócitos. Uma grande quantidade de RNAm é

transcrita em oócitos inclusos em folículos antrais iniciais, enquanto que alguns deles são traduzidos em proteínas durante a fase final de crescimento (Labrecque *et al.*, 2015), demonstrando uma correlação clara entre o aumento da condensação da cromatina e o silenciamento global na atividade de transcrição, possivelmente modulado pelas células do cumulus (Lodde *et al.*, 2008). Desta forma, a transcriptômica das células do cumulus pode trazer informações relevantes sobre o status metabólico em diferentes estágios de desenvolvimento oocitário (Luciano *et al.*, 2014).

Estudos recentes do transcriptoma das células do cumulus e de oócitos bovinos com diferentes padrões de condensação da cromatina (Dieci *et al.*, 2016) e oriundos de folículos de diferentes diâmetros revelaram alterações na abundância relativa de transcritos durante a foliculogênese, as quais podem ser correlacionadas com a aquisição de competência oocitária (Labrecque *et al.*, 2016). Isso sugere que possam haver alguns marcadores biológicos envolvidos na aquisição de competência oocitária, além de vias e mecanismos importantes nas células somáticas que alteram a qualidade oocitária, com potencial utilidade para decifrar os mecanismos específicos dos genes no processo de condensação progressiva da cromatina e na aquisição de competência para o desenvolvimento (Dieci *et al.*, 2016).

Assim sendo, os estudos disponíveis na literatura disponível demonstram que durante o crescimento oocitário, a atividade transcricional é intensa, mas é parcialmente interrompida com a retomada da meiose, o que compromete a aquisição de competência oocitária (Sirard, 2001). O controle do desenvolvimento oocitário até a ativação do genoma embrionário é realizado através da tradução de RNAm e não da transcrição, pois a atividade transcricional é quiescente nos oócitos que já completaram o seu crescimento (Martins e Conti, 2018). Por isso, as ações para melhorar a maturação devem ser realizadas antes da retomada da meiose (Sirard, 2001).

2.2 Maturação oocitária

A maturação do oócito depende de sua interação e desenvolvimento coordenado com as células somáticas ao seu redor (revisado por Conti e Franciosi, 2018), as quais estão conectadas entre si e com o oócito por meio de junções *gap*.

A maturação oocitária compreende alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que garantem a capacidade do oócito para ser adequadamente fertilizado e prosseguir o desenvolvimento embrionário inicial (Ferreira *et al.*, 2009). Esse processo, é regulado por fatores parácrinos e hormonais que interagem por meio da comunicação entre o oócito e as células da granulosa e do cumulus ao seu redor (revisado por Conti e Franciosi, 2018).

2.2.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose a partir da fase de diplóteno da prófase I, fase de GV, até a fase de metáfase II (MII), quando ocorre um novo bloqueio que se estende até a fertilização (Hurk e Zhao, 2005; Melhmann, 2005).

O controle da maturação oocitária é mediado pelos segundo mensageiros AMPc e GMPc, os quais são produzidos nas células do cumulus em resposta ao estímulo do hormônio folículo estimulante (FSH) e transportados para o oócito através de junções *gap* (Shuhaibar *et al.*, 2015). Embora a maior parte do AMPc no oócito seja proveniente das células do cumulus, também é produzido pelo próprio oócito em decorrência da ativação do receptor acoplado à proteína G com atividade adenilato-ciclase, estimulado pelo FSH (Gilchrist *et al.*, 2016).

No interior do oócito, altas concentrações de AMPc ativam a proteína cinase A (PKA) que por sua vez mantém a inativação do MPF que, conseqüentemente, mantém o bloqueio meiótico e a estrutura nuclear permanece em GV (Melhmann, 2005; Dekel, 2005; Gilchrist, 2011). Para que as concentrações intraoocitárias de AMPc permaneçam altas, a PDE3A, enzima específica do oócito que degrada o AMPc no oócito, é inibida pelo GMPc (Norris *et al.*, 2009; Vaccari *et al.*, 2009). O

GMPc é produzido nas células do cumulus, via interação dos peptídeos natriuréticos tipo B (BNP) e tipo C (CNP) com o receptor do peptídeo natriurético do tipo 2 (NPR2; Zhang *et al.*, 2014), sendo posteriormente transferido para o oócito onde vai inibir a atividade da PDE3A (Norris *et al.*, 2009).

Para a retomada da meiose e consequente quebra da vesícula germinativa (GVBD) com progressão até MII, a concentração intraoocitária de AMPc diminui, resultando em redução da atividade da PKA, desfosforilação da ciclina dependente de cinase do tipo 1 (CDK1) e ativação do MPF (Dekel, 2005; Bilodeau-Goeseels, 2011; Gilchrist, 2011; Gilchrist *et al.*, 2016). O MPF ativo fosforila tanto as proteínas que formam o envelope nuclear quanto as envolvidas na condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto. Desta forma, a meiose é retomada e progride até a fase de MII, sendo então concluída a maturação nuclear (Hurk e Zhao, 2005).

In vivo, a retomada da meiose é desencadeada a partir do estímulo do hormônio luteinizante (LH) que ocorre antes da ovulação. A ativação dos receptores de LH localizados nas células da granulosa murais induz à produção de fatores de crescimento semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), os quais ativam o EGFR (Park *et al.*, 2004). Consequentemente, há ativação da via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), ocorre a fosforilação da conexina 43 e o fechamento das junções *gap* (Norris *et al.*, 2008), culminando em GVBD e expansão das células do cumulus (Reizel *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2004; Jamnongjit *et al.*, 2005).

Paralelamente à todas essas alterações, a expressão de NPR2 é também reduzida, assim como a produção dos peptídeos natriuréticos nas células do cumulus. Consequentemente, a transferência de GMPc para o oócito é interrompida, provocando um rápido decréscimo dos níveis de GMPc que culminam com a retomada da meiose (Norris *et al.*, 2009; Norris *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

Na situação *in vitro*, a retomada da meiose não ocorre pela ativação por LH, mas espontaneamente em decorrência da remoção do oócito do ambiente folicular e subsequente cultivo *in vitro* em meio e condições apropriadas (Blondin *et al.*, 1997; Bilodeau-Goeseels, 2011). A maturação espontânea pode alterar a sequência fisiológica e sincronizada dos eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares, comprometendo a aquisição de competência oocitária. Isso porque o bloqueio meiótico imposto pelo folículo permite que o oócito adquira, durante o crescimento folicular, as diferenciações necessárias que o permitam sustentar o desenvolvimento

embrionário inicial. Por isso, o processo de aquisição da competência oocitária é finalizado somente quando os folículos antrais atingem o tamanho pré-ovulatório (revisado por Conti e Franciosi, 2018).

2.2.2 Maturação citoplasmática

Paralelamente à maturação nuclear, ocorre a maturação citoplasmática, a qual engloba alterações na disposição, morfologia e função das organelas citoplasmáticas (Hurk e Zhao, 2005; Melhmann, 2005), além do acúmulo de transcritos (Ferreira *et al.*, 2009).

A alteração na disposição das organelas ocorre de acordo com as necessidades metabólicas do oócito e é dependente do citoesqueleto, composto de microtúbulos e microfilamentos (Ferreira *et al.*, 2009). Por exemplo, as mitocôndrias são organelas responsáveis pelo fornecimento de energia através da fosforilação oxidativa (Cummins, 2004; Tarazona *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2014) e, durante a maturação oocitária, se movimentam para áreas de alto consumo de energia (Mao *et al.*, 2014). Dessa forma, enquanto distribuem-se na periferia de oócitos imaturos, as mitocôndrias tomam uma posição mais central e ficam agrupadas ao redor de gotas de lipídeos no oócito maduro (Stojkovic *et al.*, 2001). Esse padrão de atividade e de distribuição das mitocôndrias está relacionado com a competência oocitária (Tarazona *et al.*, 2006; Jeseta *et al.*, 2014).

O citoesqueleto também está envolvido com a maturação nuclear, participando da divisão meiótica na formação das fibras do fuso e na extrusão do corpúsculo polar (Li *et al.*, 2005). Os microfilamentos, compõem a maior parte do citoesqueleto (Kim *et al.*, 2000) e estão sempre dispostos na região cortical do oócito, formando um anel (Li *et al.*, 2005). Anormalidades na disposição cortical dos microfilamentos estão associadas com baixa competência oocitária (Somfai *et al.*, 2011) e apoptose (Roth e Hansen, 2005).

Apesar de já ser bem descrita a importância da maturação nuclear e citoplasmática para determinar o sucesso da maturação oocitária, os componentes moleculares ainda precisam ser melhor investigados para determinar, de forma mais clara, o papel de cada um dos inúmeros fatores já identificados na aquisição da

competência do oócito para o desenvolvimento embrionário (revisado por Conti e Franciosi, 2018).

2.3 Papel do EGFR na maturação oocitária

A aquisição de competência oocitária durante a foliculogênese parece estar relacionada, dentre outros fatores já descritos anteriormente, com a ativação do EGFR, um receptor transmembrana do tipo tirosina quinase (Richani e Gilchrist, 2017). Em suínos, foi verificado que o RNAm desse receptor é expresso nas células do cumulus e nas granulosa de folículos antrais pequenos (<4 mm) e médios (> 4 mm), mas a proteína é encontrada somente nos folículos antrais médios, demonstrando a ausência de resposta do receptor nos folículos menores (Ritter *et al.*, 2015; Sugimura *et al.*, 2015). Assim, ocorre uma aquisição progressiva da capacidade de ativação do EGFR de acordo com o crescimento folicular, o que coincide com a aquisição da competência oocitária (Ritter *et al.*, 2015; Sugimura *et al.*, 2015). Portanto, a capacidade das células do cumulus responderem à ativação da via do EGFR está inter-relacionada com a aquisição da competência oocitária para o desenvolvimento, mediada principalmente pelo FSH, AMPc e PKA, mas também por fatores secretados pelo oócito (Richani e Gilchrist, 2017).

A ativação do EGFR está envolvida na retomada da meiose pelo estímulo do LH, o qual se liga a receptores de membrana específicos (LHCGR) para promover suas ações, dentre elas, a retomada da meiose, a síntese de componentes da matriz extracelular pelas células do cumulus e a luteinização da células da granulosa murais; acompanhadas ainda pelas alterações na expressão de RNAm, síntese proteica e produção de hormônios (Prochazka *et al.*, 2017). Uma vez que o oócito e as células do cumulus possuem poucos ou nenhum receptor de LH, a ação do mesmo é mediada por segundo mensageiros que trafegam a partir das células da granulosa murais para o oócito através das junções *gap* (Park *et al.*, 2004; Jamnongjit *et al.*, 2005), principalmente o AMPc, que é produzido a partir da ligação do LH ao LHCGR, receptor acoplado à proteína G, com atividade adenilato-ciclase (Conti *et al.*, 2002).

O AMPc induz à produção de fatores EGF-like (epirregulina, ampirregulina e betacelulina) nas células da granulosa (Park *et al.*, 2014), os quais ativam a tirosina quinase intrínseca do receptor, promovendo a auto-fosforilação de resíduos de tirosina específicos no domínio citoplasmático. Em seguida, proteínas-alvo são fosforiladas e/ou recrutadas para a ativação de outras vias (Pangione *et al.*, 2008) que regulam a maturação oocitária, a expansão das células do cumulus e a ovulação (Park *et al.*, 2014).

Nas células da granulosa e do cumulus, as MAPK [também denominada quinases reguladoras de sinais extracelulares (ERK), que são proteínas serina/treonina quinase, com as isoformas ERK1 e ERK 2 envolvidas na meiose] necessitam de fosforilação para tornarem-se ativas (Fan e Sun, 2004), a qual é dependente da atividade contínua do EGFR (Reizel *et al.*, 2010). Porém, apesar da dependência do EGFR ativo, outros mecanismos regulam a atividade da MAPK, uma vez que o bloqueio do EGFR reduz apenas 60% da fosforilação da MAPK (Pangione *et al.*, 2008). Além disso, sua ativação ocorre ao mesmo tempo ou logo após a GVBD, demonstrando que apesar de seu papel na maturação nuclear, ela não é necessária para a ativação do MPF e pra a GVBD (Fan e Sun, 2004).

A ativação do EGFR nas células do cumulus induz a expressão de genes necessários para a expansão das células do cumulus (Prochazka *et al.*, 2012), caracterizada pela produção de uma matriz extracelular rica em proteoglicanos que é essencial para a ovulação e captura do oócito pelo infundíbulo (Sugimura *et al.*, 2015). Essa expansão leva ao fechamento das junções *gap* pela fosforilação da conexina 43, desencadeada pela MAPK (Norris *et al.*, 2008; Prochazka *et al.*, 2017). Esse mecanismo foi anteriormente confirmado pelo bloqueio do EGFR, que diminuiu a expressão de genes relacionados com a expansão das células do cumulus e a ovulação (Ashkenazi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2004; Reizel *et al.*, 2010).

Sabe-se que a manutenção da integridade das junções *gap* durante o bloqueio meiótico é benéfica para a aquisição de competência oocitária (Gilchrist *et al.*, 2016). Portanto, uma vez demonstrado o envolvimento do EGFR no fechamento das junções *gap*, pode-se especular que o uso de substâncias capazes de bloquear a ativação do receptor parece ser uma alternativa interessante para melhorar a competência oocitária. O bloqueio da tirosina quinase do EGFR por AG1478 impede a fosforilação do EGFR e a consequente maturação oocitária em cultivo de folículos ovarianos, mesmo que estimulados pelo LH (Ashkenazi *et al.*, 2005; Norris *et al.*,

2010). Esse bloqueio da meiose também ocorre no cultivo de oócitos, mesmo que estimulados com fatores EGF-like ou com o próprio LH (Park *et al.*, 2004; Reizel *et al.*, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a expressão do EGFR parece ser regulada pelo AMPc, uma vez que esta foi aumentada em oócitos tratados com um análogo do AMPc e um inibidor de fosfodiesterase (dbcAMP e IBMX). Além disso, foi verificado aumento da expressão de genes relacionados à expansão das células do cumulus (*HAS2*, *TNFAIP6* e *PTGS2*) que são ativados pela via do EGFR e as maiores taxas de desenvolvimento embrionário obtidas com o tratamento não foram evidenciadas quando os oócitos foram tratados com um inibidor do EGFR, o AG1478 (Sugimura *et al.*, 2018). Desta forma, o estudo da via do EGFR é fundamental no entendimento do processo de aquisição de competência oocitária. Porém, é necessário investigar o quão conservada ela é entre as espécies (Zhang *et al.*, 2014), uma vez que a maioria dos estudos foram feitos em camundongos. Além disso, é uma alternativa para melhorar os sistemas de cultivo de oócitos que foram desenvolvidos antes dos estudos que evidenciaram a importância da via do EGFR na maturação e qualidade oocitária (Richani e Gilchrist, 2017).

2.4 Modulação do bloqueio meiótico

A MIV compromete a competência oocitária em comparação com a maturação *in vivo*, possivelmente porque oócitos maturados *in vivo* são provenientes de folículos pré-ovulatórios, enquanto que a maioria dos oócitos destinados para a MIV são recuperados de folículos ainda em fase de crescimento, com diâmetro entre 2 e 8 mm (Rizos *et al.*, 2002). Os oócitos inclusos nestes folículos estão bloqueados em GV e possuem competência meiótica para atingir o estágio de MII (Gilchrist *et al.*, 2016), porém apresentam diferentes graus de condensação da cromatina e variada competência de desenvolvimento subsequente (Luciano *et al.*, 2011; Lodde *et al.*, 2013). Assim, essa heterogeneidade de oócitos, obtidos de uma população folicular heterogênea, pode ser responsável pela menor competência dos oócitos MIV.

Dessa forma, a PIV ainda não atingiu o mesmo patamar de eficiência quando comparado à produção *in vivo*, pois a maturação, qualidade e quantidade de oócitos são fatores limitantes para o sucesso de tecnologias reprodutivas (Gilchrist *et al.*, 2016). Apesar das tentativas de manipular as condições de cultivo dos complexos cumulus-oócito (COC), visando aumentar a competência oocitária, somente 32% dos oócitos maturados e fertilizados *in vitro* se desenvolvem até o estágio de blastocisto (Perry, 2018).

Portanto, na tentativa de aumentar a competência dos oócitos MIV, o controle da meiose pode ser feito através do uso de inibidores da maturação nuclear em uma etapa denominada pré-maturação, com o intuito de permitir mais tempo em cultura para que a competência oocitária seja maior ao término do processo (Hendriksen *et al.*, 2000). Essa estratégia visa manter a integridade da comunicação entre o oócito e as células do cumulus durante a pré-maturação (Gilchrist, 2011), visto que a quebra prematura da comunicação entre o oócito e as células do cumulus, quando da remoção do oócito do ambiente folicular para os procedimentos de PIV, ocasiona a condensação rápida e prematura da cromatina e interrompe a atividade transcricional, diminuindo a competência oocitária (Luciano *et al.*, 2011; Lodde *et al.*, 2013). Portanto, a manutenção da comunicação por um período maior durante o cultivo de pré-maturação permite melhor diferenciação do oócito, aumentando o potencial para o desenvolvimento embrionário (Lodde *et al.*, 2013).

O bloqueio meiótico no cultivo de pré-maturação pode ser alcançado através do uso de drogas com diversos mecanismos de ação (revisado por Melhmann, 2005): os inibidores de PDE, como a cilostamida (Albuz *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2014; Dieci *et al.*, 2016; Dall'Acqua *et al.*, 2017), milrinona (Dall'Acqua *et al.*, 2017) ou IBMX (Albuz *et al.*, 2010; Dall'Acqua *et al.*, 2017; Razza *et al.*, 2018), mantém as concentrações de AMPc elevadas por impedir a degradação do mesmo pela inativação das PDE; os ativadores da adenilato-ciclase, como a forskolina (Albuz *et al.*, 2010; Dall'Acqua *et al.*, 2017; Razza *et al.*, 2018), estimulam a síntese de AMPc; o NPPC (Franciosi *et al.*, 2014) reduz as concentrações de AMPc indiretamente, pelo aumento de GMPc que inibe a ativação das PDE; e, mais recentemente, foi proposto o uso de inibidores do EGFR que ainda foi pouco estudado em bovinos (Da Rosa *et al.*, 2017).

Apesar de estarem descritos na literatura diversos estudos que utilizaram os bloqueadores da meiose com os diferentes mecanismos de ação descritos acima,

nenhum deles demonstrou haver benefícios substanciais para a PIV em bovinos, o que nos encoraja a estudar outras substâncias que podem ser utilizadas com esse intuito e têm potencial para melhoria da competência oocitária.

3 Referências

Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB (2010) Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction** 25:2999-3011. doi: 10.1093/humrep/deq246.

Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiri A (2005) Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology** 146:77-84. doi:0.1210/en.2004-0588.

Bilodeau-Goeseels S (2011) Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development** 78:734-743. doi: 10.1002/mrd.21337.

Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA (1997) In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology** 47:1061-1075. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00063-0.

Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiri A (2002) Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology** 187:153-159. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00686-4.

Conti M, Franciosi F (2018) Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. **Human Reproduction Update** 24:245-266. doi:10.1093/humupd/dmx040.

Cummins JM (2004) The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** 115S:S23-S29. doi: 10.1016/j.ejogrb.2004.01.011.

Dekel N (2005) Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology** 234:19-25. doi: 10.1016/j.mce.2004.09.010.

Da Rosa PRA, De Cesaro MP, Dau AMP, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves PBD (2017) Reversible meiotic arrest of bovine oocytes by EGFR inhibition and follicular hemisections. **Theriogenology** 99:53-62. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.014.

Dall'Acqua PC, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Gottardi FP, Mingoti GZ (2017) Delaying meiotic resumption during transportation of bovine cumulus-oocyte complexes: effects on development, apoptosis and caspases activity of in vitro-produced embryos. **Zygote** 25:740-450. doi: 10.1017/S0967199417000636.

Dieci C, Lodde V, Labreque R, Dufort I, Tessaro I, Sirard MA, Luciano AM (2016) Differences in cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine embryo production. **Molecular Human Reproduction** 22:882–897. doi: 10.1093/molehr/gaw005.

Fair T (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science** 78:203–216. doi:10.1016/S0378- 4320(03)00091-5.

Fan HY, Sun QY (2004) Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction** 70:535-547. doi: 10.1095/biolreprod.103.022830.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology** 71:836-848. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023.

Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modina SC, Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM (2014) Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction** 91:61 doi: 10.1095/biolreprod.114.118869.

Gilchrist (2011) Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development** 23:23-31. doi: 10.1071/RD10225.

Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, De Vos M, Sugimura S, Smitz J, Richard FJ, Thompson JG (2016) Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction** 152:R143-R157. doi: 10.1530/REP-15-0606.

Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers NM, Dieleman SJ (2000) Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology** 53:11-20. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00236-8.

Hurk VDR, Zhao J (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology** 63:1717-1751. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.005.

Jamnongjit M, Gill A, Hammes SR (2005) Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **PNAS** 102:16257-16262. doi: 10.1073/pnas.0508521102.

Jeseta M, Knitlova DC, Hanzalova K, Hulinska P, Hanulakova S, Milakovic I, Nemcova L, Kanka J, Machatkova M (2014) Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. **Reproduction in Domestic Animals** 49:469-475. doi: 10.1111/rda.12313.

Kim N, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park SP, Lim JH (2000) The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. **Zygote** 8:25-32.

Labrecque R, Lodde V, Dieci C, Tessaro I, Luciano AM, Sirard MA (2015) Chromatin remodeling and histone mRNA accumulation in bovine germinal vesicle oocytes. **Molecular Reproduction and Development** 82:450-462. doi: 10.1002/mrd.22494.

Labrecque R, Fournier E, Sirard MA (2016) Transcriptome analysis of bovine oocytes from distinct follicle sizes: Insights from correlation network analysis. **Molecular Reproduction and Development** 83:558-569. doi: 10.1002/mrd.22651

Li G, Liu Y, Bunch TD, White KL, Aston KI (2005) Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. **Molecular Reproduction and Development** 71:220-226. doi: 10.1002/mrd.20255.

Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM (2007) Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development** 74:740–749. doi: 10.1002/mrd.20639.

Lodde V, Modina S, Hyttel PM, Franciosi F, Lauria A, Luciano AM (2008) Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development** 75:915-924. doi: 10.1002/mrd.20824.

Lodde V, Franciosi F, Tessaro I, Modina SC, Luciano AM (2013) Role of gap junction-mediated communication in regulating large-scale chromatin remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 30:1219-1226. doi: 10.1007/s10815-013-0061-7.

Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V (2014) Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: A journey in company with follicular cells. **Animal Reproduction Science** 149:3-10. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.06.026.

Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V (2011) Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction** 85:1252-1259. doi: 10.1095/biolreprod.111.092858.

Luciano AM, Franciosi F, Barros RG, Dieci C, Lodde V (2018) The variable success of in vitro maturation: can we do better? **Animal Reproduction** 15:727-736. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0021.

Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F (2014) Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online** 28:284-299. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.10.016.

Mehlmann LM (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction** 130:791-799. doi: 10.1530/rep.1.00793.

Martins JPS, Conti M (2018) Profiling maternal mRNA translation during oocyte development. **Methods in Molecular Biology** 1818:43-50. doi: 10.1007/978-1-4939-8603-3_6.

Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA (2008) Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development** 135:3229-3238. doi: 10.1242/dev.025494.

Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA (2010) EGF receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to luteinizing hormone. **Reproduction** 140:655-662. doi: 10.1530/REP-10-0288.

Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA (2009) Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development** 136:1869-1878. doi: 10.1242/dev.035238.

Pangione S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M (2008) Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. **Molecular Endocrinology** 22:924-936. doi: 10.1210/me.2007-0246.

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science** 303:682–684. doi: 10.1126/Science.1092463.

Perry G (2018) 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**. doi:10.13140/RG.2.2.24793.42087.

Prochazka R, Blaha M, Nemcova L (2012) Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. **Reproduction** 144:535-546. doi: 10.1530/REP-12-0191.

Prochazka R, Blaha M, Němcová L (2017) Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. **Biology of Reproduction** 97:537-549. doi: 10.1093/biolre/iox112.

Razza EM, Sudano MJ, Fontes PK, Franchi FF, Belaz KRA, Santos PH, Castilho ACS, Rocha DFO, Eberlin MN, Machado MF, Nogueira MF (2018) Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus-oocyte complexes and blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development** Apr 23. doi: 10.1071/RD17335.

Reizel Y, Elbaz J, Dekel N (2010) Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. **Molecular Endocrinology** 24:402-411. doi: 10.1210/me.2009-0267.

Richani D, Gilchrist, RB (2017) The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. **Human Reproduction Update** 24:1-14. doi: 10.1093/humupd/dmx029.

Ritter LJ, Sugimura S, Gilchrist RB (2015) Oocyte induction of EGFR responsiveness in somatic cells is associated with the acquisition of porcine oocyte developmental competence. **Endocrinology** 156:2299-2312. doi: 10.1210/en.2014-1884.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, 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. doi: 10.1002/mrd.1153.

Roth Z, Hansen PJ (2005) Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction** 129:235-244. doi: 10.1530/rep.1.00394.

Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA (2015) Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. **PNAS** 112:5527-5532. doi: 10.1073/pnas.1423598112.

Sirard MA (2011) Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 28:483-488. doi: 10.1007/s10815-011-9554-4.

Somfai T, Kikuchi K, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Mizutani E, Haraguchi S, Dang-Nguyen TQ, Inaba Y, Geshi M, Nagai T (2011) Cytoskeletal abnormalities in relation with meiotic competence and ageing in porcine and bovine oocytes during in vitro maturation. **Journal of Veterinary Medicine** 40:335-344. doi: 10.1111/j.1439-0264.2011.01079.x.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction** 64:904-909. doi: 10.1095/biolreprod64.3.904.

Sugimura S, Ritter LJ, Rose RD, Thompson JG, Smitz J, Mottershead DG, Gilchrist RB (2015) Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. **Developmental Biology** 403:139-149. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.05.008.

Sugimura S, Yamanouchi T, Palmerini MG, Hashiyada Y, Imai K, Gilchrist RB (2018) Effect of pre-in vitro maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte developmental competence in cattle. **Journal of Reproduction and Development** 64:233-241. doi: 10.1262/jrd.2018-009.

Sun QY, Miao YL, Schatten H (2009) Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. **Cell Cycle** 8:17,2741-2747. doi: 10.4161/cc.8.17.9471.

Tarazona AM, Rodríguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M (2006) Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals** 41:5-11. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00615.x.

Vaccari S, Weeks II JL, Hsieh M, Menniti FS, Conti M (2009) Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of Reproduction** 81:595-604. doi: 10.1095/biolreprod.109.077768.

Zhang W, Chen Q, Yang Y, Liu W, Zhang M, Xia G, Wang C (2014) Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. **Molecular Reproduction and Development** 81:1030-1041. doi: 10.1002/mrd.22424.

CAPÍTULO 2 – A modulação da sinalização do receptor do fator de crescimento epidermal durante a pré-maturação altera a cinética do remodelamento da cromatina e o perfil de transcritos de complexos cumulus-oócito bovinos

Resumo

A retomada da meiose ocorre por intermédio da ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), o qual é ativado por estímulo gonadotrófico. Para inibir a retomada precoce da meiose durante o cultivo de pré-maturação (PMIV), foi utilizado um inibidor do EGFR, AG1478, e foi avaliado o bloqueio e a reversibilidade da meiose, a expansão das células do cumulus, a funcionalidade das junções gap, a distribuição dos microfilamentos de actina e o conteúdo lipídico em oócitos bovinos e, a expressão gênica nas células do cumulus destes oócitos. Os COC foram PMIV por 8h em meio com 1 μ M de AG1478, (EGFR-PreIVM), em seguida foram MIV por 22h (EGFR-IVM); foram feitos 4 grupos controle: oócitos imaturos imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat), oócitos MIV por 8h (Control_PreIVM), oócitos MIV por 22h (Control_IVM_22h) e oócitos MIV por 30h (Control_IVM_30h). O grupo EGFR-PreIVM apresentou 42,9% dos oócitos em GV1 ($P>0,05$) e 28,6% em GV3, semelhante ao grupo Control_Immat (67,6% e 12,4%, respectivamente; $P>0,05$) e menor que o grupo Control_PreIVM (20,7% e 52,1%, respectivamente; $P<0,05$). Após a MIV os grupos não diferiram na taxa de MII ($P>0,05$), mas o grupo Control_IVM_30h (9,1%) apresentou maiores ($P<0,05$) taxas de oócitos degenerados comparado com o grupo EGFR-IVM (2,3%). O grau de expansão das células do cumulus foi menor ($P<0,05$) no grupo EGFR-PreIVM e não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos após a MIV. As junções gap permaneceram abertas após a PMIV no grupo EGFR-PreIVM (85,7%), não diferindo ($P<0,05$) do grupo Control_Immat (88,9%), enquanto que menores ($P<0,05$) taxas foram encontradas no grupo Control_PreIVM (35,7%). Os microfilamentos de actina estavam em sua maioria na categoria normal após a PMIV e após a MIV, sem diferença entre os grupos ($P>0,05$). O conteúdo lipídico foi menor ($P<0,05$) após a PMIV no grupo EGFR-PreIVM comparado com Control_Immat, mas após a MIV foi maior ($P<0,05$) no grupo EGFR-IVM do que no Control_IVM. Os genes de maturação oocitária, expansão das células do cumulus, metabolismo, metabolismo lipídico, qualidade embrionária, desenvolvimento embrionário, regulação epigenética, estresse do retículo endoplasmático, defesa antioxidante e apoptose foram diferencialmente expressos ($P<0,05$) após a PMIV e, os genes de expansão das células do cumulus, metabolismo e qualidade embrionária foram diferencialmente expressos ($P<0,05$) após a MIV. Em conclusão, os resultados demonstraram um retardo na progressão da meiose com manutenção das junções gap funcionais durante o cultivo de PMIV, sugerindo potencial aquisição de competência oocitária durante a PMIV com inibidor do EGFR.

1 Introdução

A biotecnologia de produção *in vitro* de embriões (PIV) na espécie bovina tem sido utilizada em larga escala tanto para finalidades comerciais como de pesquisa. Apesar disso, ainda esbarra em alguns fatores limitantes, como a qualidade e a quantidade de oócitos (Gilchrist *et al.*, 2016), que são a matéria prima para a realização da PIV. Devido a essas limitações, os resultados de PIV encontram-se estagnados há algum tempo e são raros os relatos de produção embrionária acima de 30 a 40% (Sirard, 2018). A baixa eficiência da etapa de maturação *in vitro* (MIV) pode ser atribuída, dentre outros fatores, ao uso de uma população heterogênea de oócitos ainda em desenvolvimento (Rizos *et al.*, 2002), oriundos de folículos de tamanhos variados (2 a 8 mm). *In vivo*, quando incluídos em folículos, a meiose dos oócitos está bloqueada no estágio de prófase I da primeira redução meiótica (denominado estágio de vesícula germinativa - GV). Foi demonstrado que a configuração da cromatina no estágio de GV apresenta condensação progressiva, classificada de GV0 à GV3 (Lodde *et al.*, 2007) e que está relacionada com a diferenciação do oócito para aquisição de competência oocitária (Luciano *et al.*, 2011). Portanto, a remoção precoce (não fisiológica) dos oócitos do ambiente folicular para utilização na biotecnologia de PIV estimula a retomada espontânea da meiose, o que prejudica a competência oocitária (Blondin *et al.*, 1997; Bilodeau-Goeseels, 2011) e se reflete na dificuldade de melhoria nas taxas de PIV.

A maturação do oócito *in vivo* é iniciada antes da ovulação, como resposta ao estímulo endógeno do hormônio luteinizante (LH) para que o oócito bloqueado em GV retome a meiose (Blondin *et al.*, 1997; Bilodeau-Goeseels, 2011). A sinalização do LH a partir da sua ligação a receptores de membrana específicos (LHCGR) nas células da granulosa murais (Prochazka *et al.*, 2017) promove a secreção de fatores de crescimento semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-like: epirregulina, ampirregulina e betacelulina) por estas células (Park *et al.*, 2004). Subsequentemente, os peptídeos EGF-like ativam o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) nas células da granulosa e do cumulus, estimulando a produção de esteroides ovarianos (Jamnongjit *et al.*, 2005), a expansão das células do cumulus e consequentemente a quebra da GV (GVBD; Reizel *et al.*,

2010), mecanismos que acontecem no folículo pré-ovulatório a partir do estímulo do LH até a ovulação (Park *et al.*, 2004).

Isso acontece pela sinalização de segundo mensageiros, monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e o monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), produzidos nas células do cumulus por estímulo do LH (Conti *et al.*, 2002), os quais são transportados para o oócito através de junções *gap* (Norris *et al.*, 2009). O AMPc também é produzido pelo próprio oócito através de um receptor acoplado à proteína G com atividade adenilato-ciclase e é estimulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH), porém, a maior parte do AMPc é proveniente das células do cumulus (Gilchrist *et al.*, 2016). No interior do oócito, altas concentrações de AMPc inibem a ativação do fator promotor da maturação (MPF) e mantém o bloqueio meiótico em GV (Dekel, 2005; Gilchrist, 2011). Para isso, a fosfodiesterase 3A (PDE3A), enzima que degrada o AMPc no oócito, é inibida pelo GMPc (Norris *et al.*, 2009; Vaccari *et al.*, 2009). Por outro lado, para a retomada da meiose, a concentração intraoocitária de AMPc diminui, promovendo a defosforilação e ativação da proteína cinase A (PKA) e consequente ativação do fator promotor da maturação (MPF; Gilchrist *et al.*, 2016). A queda do GMPc e do AMPc acontece primeiramente pelo fechamento das junções *gap* provocado por estímulo do LH, que ativa o EGFR e, consequentemente, a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), desencadeando a fosforilação da conexina 43 (Norris *et al.*, 2008) e o fechamento das junções *gap*.

Sabe-se que a manutenção da integridade das junções *gap* durante o bloqueio meiótico é benéfica para a aquisição de competência oocitária (Gilchrist *et al.*, 2016) e, uma vez demonstrado o envolvimento do EGFR no fechamento das junções *gap*, o uso de substâncias capazes de bloquear a ativação deste receptor para manter as junções *gap* abertas por mais tempo, parece ser uma alternativa interessante para melhorar a competência dos oócitos cultivados *in vitro*. Visto que a maturação oocitária é regulada por diversos mecanismos que atuam em conjunto no folículo ovariano para controlar o bloqueio e depois a retomada da meiose, com consequente progressão de GV até metáfase II (MII), ou seja, a maturação nuclear e também as alterações moleculares e citoplasmáticas (Ferreira *et al.*, 2009). A remoção do oócito do ambiente folicular provoca um desequilíbrio desses agentes regulatórios da meiose, desencadeando uma menor eficiência de maturação quando comparada à que ocorre *in vivo*. Portanto, na tentativa de aumentar a competência dos oócitos MIV, o controle da meiose pode ser feito através do uso de inibidores da

maturação nuclear em uma etapa denominada pré-maturação. Com o intuito de garantir a competência oocitária ao término do processo (Hendriksen *et al.*, 2000).

Visto que a quebra prematura da comunicação entre o oócito e as células do cumulus, quando da remoção do oócito do ambiente folicular para os procedimentos de PIV, ocasiona uma condensação rápida e prematura da cromatina e interrupção da atividade transcricional, diminuindo a competência oocitária (Luciano *et al.*, 2011; Lodde *et al.*, 2013) e, a manutenção da comunicação por um período maior durante o cultivo de pré-maturação permite o crescimento final e a diferenciação do oócito, aumentando o potencial para desenvolvimento embrionário (Lodde *et al.*, 2013). Os estudos mais recentes visam manter a comunicação entre o oócito e as células do cumulus durante a pré-maturação (Gilchrist, 2011).

Esse cultivo de pré-maturação para o bloqueio meiótico e manutenção da comunicação entre o oócito e as células do cumulus pode utilizar substâncias com diversos mecanismos de ação: os inibidores de PDE, como a cilostamida, milrinona ou IBMX que mantém altas concentrações de AMPc por impedir a degradação do mesmo pela inativação das PDE; os ativadores da adenilato-ciclase, como a forskolina, que estimulam a síntese de AMPc; o NPPC que reduz as concentrações de AMPc indiretamente, pelo aumento de GMPc o qual inibe a ativação das PDE e; mais recentemente, foi proposto o uso de inibidores do EGFR os quais não foram muito estudados em bovinos (Melhmann, 2005; Albuz *et al.*, 2010; Dieci *et al.*, 2013; Franciosi *et al.*, 2014; Dieci *et al.*, 2016; Dall'Acqua *et al.*, 2017; Da Rosa *et al.*, 2017; Razza *et al.*, 2018).

Como o mecanismo de maturação em oócitos é dependente da ativação do EGFR nas células do cumulus, a hipótese deste estudo é que a inibição do EGFR em um cultivo de pré-maturação de oócitos bovinos pode manter o bloqueio meiótico e as junções *gap* abertas, permitindo um tempo maior de cultivo para o oócito adquirir competência de desenvolvimento e, o estudo da expressão gênica das células do cumulus pode evidenciar vias de regulação envolvidas na maturação oocitária desencadeada pelo EGFR. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o bloqueio da meiose e sua reversibilidade, a manutenção da comunicação entre o oócito e as células do cumulus via junções *gap*, a dinâmica dos microfilamentos de actina, o conteúdo lipídico nos oócitos e a expressão gênica das células do cumulus.

2 Material e métodos

Os reagentes químicos utilizados foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), caso contrário estão especificados no texto. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, SP, Brasil, protocolo número 12354/15.

2.1 Obtenção e seleção de COC

Ovários de bovinos *Bos taurus*, obtidos de abatedouro, foram transportados ao laboratório em solução salina estéril à 30-35°C. Os COC foram obtidos através de punção com agulha 18-G e seringa de 10 mL de folículos antrais médios (2-8mm). A seleção dos COC foi feita em fluido folicular, suplementado com 75 µg/mL de penicilina-estreptomicina, para prevenir a retomada imediata da meiose. Apenas COC circundados por pelo menos quatro camadas de células do cumulus compactas e citoplasma com granulação homogênea foram utilizados nesse estudo.

2.2 Pré-maturação e MIV

Os oócitos que foram submetidos ao bloqueio meiótico foram cultivados *in vitro* em microgotas de 100 µL (25 COC por microgota) de TCM199 suplementado com 0,2 mM piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 50 µg/mL amicacina, 0.3% BSA livre de ácidos graxos e 1 µM do inibidor do EGFR (EGFR-) AG1478, recobertas com óleo mineral. O cultivo foi conduzido por 8h à 38,5°C, 5% CO₂ em ar e máxima umidade (grupo EGFR-_PreIVM). Em seguida, os oócitos bloqueados foram lavados várias vezes no mesmo meio sem o inibidor para a completa remoção do bloqueador e, transferidos para microgotas de 100 µL de meio de MIV [TCM199 suplementado com 0,2 mM piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 50 µg/mL amicacina, 0,5 µg/mL

FSH (Follitropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 UI/mL gonadotrofina coriônica humana (Vetecor; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% soro fetal bovino (FCS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)] recobertas com óleo mineral (grupo EGFR-IVM). O cultivo de MIV foi conduzido por até 30h à 38,5°C, 5% CO₂ em ar e máxima umidade.

Os COC do grupo controle (grupo Control) foram submetidos ao cultivo de MIV após sua remoção dos folículos, sem terem passado pelo cultivo prévio de pré-maturação. Amostras de oócitos do grupo Control foram coletadas após 8h do início da MIV (grupo Control_PreIVM: cultivados pelo mesmo período da pré-maturação), às 22h (grupo Control_IVM_22h: cultivados pelo tempo padrão de MIV no nosso laboratório), e às 30h (grupo Control_IVM_30h: cultivados pelo tempo total dos oócitos submetidos à pré-maturação seguida da MIV, objetivando avaliar o possível envelhecimento do oócito devido ao cultivo prolongado). Além disso, uma amostra dos oócitos foi coletada imediatamente após a remoção do ambiente folicular (grupo Control_Immat). Os grupos experimentais estão representados na Figura 1.

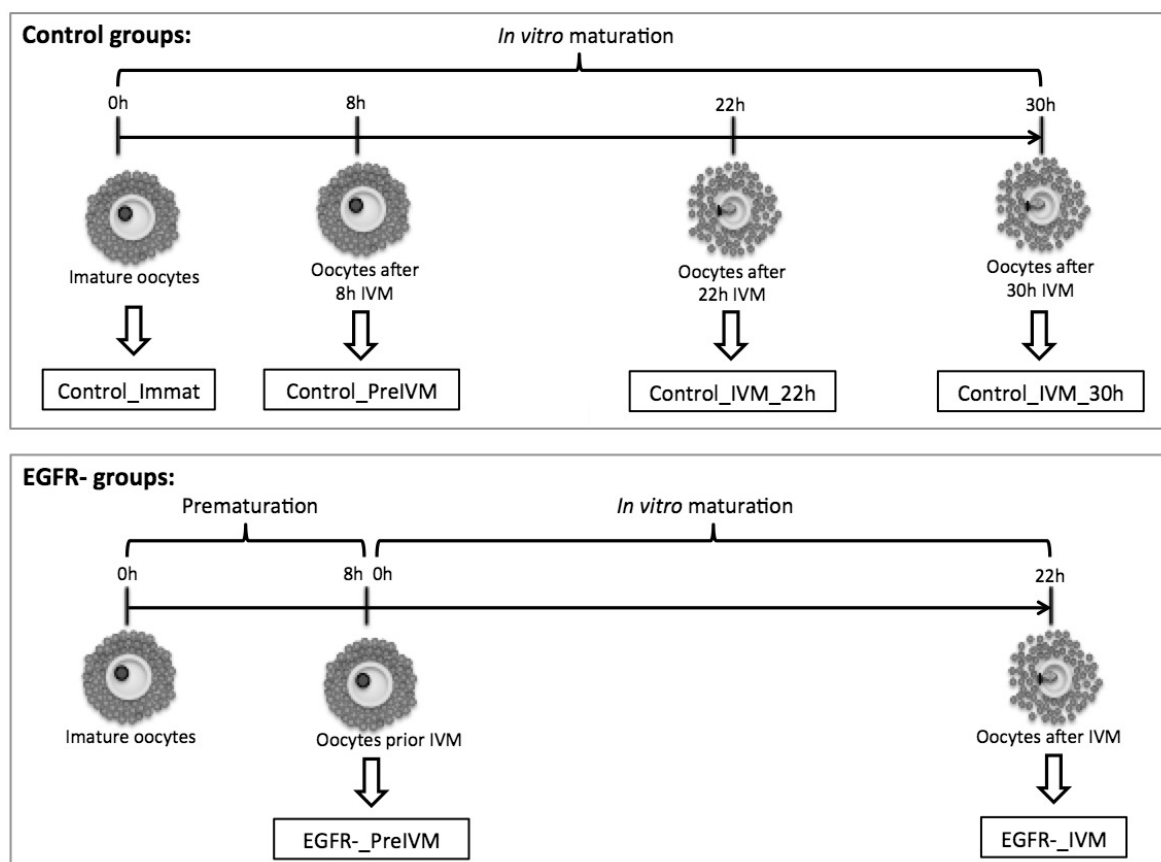


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental. As setas indicam os momentos finais de avaliação dos diferentes grupos experimentais.

2.3 Avaliação da configuração da cromatina, sua cinética e da distribuição dos microfilamentos de actina

Em cada tempo de coleta da pré-maturação e da MIV, uma amostra de 25 COC/grupo foi coletada e as células do cumulus foram separadas dos oócitos por vórtex em solução de PBS suplementada com 0,1% PVP (PBS-PVP) em água ultra-pura. Os oócitos desnudos (DO) foram avaliados de acordo com a configuração da cromatina e a distribuição citoplasmática dos microfilamentos de actina. As células do cumulus correspondentes foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C até a extração do RNA para posterior análise de expressão gênica.

DO foram fixados em solução de paraformaldeído 4% (w/v) por 10 min em temperatura ambiente e permeabilizados em 0,5% (v/v) Triton X-100 em solução 0.1% (w/v) citrato de sódio por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados em uma solução de PBS-PVP contendo Hoechst 33342 (1 µg/mL) e faloidina conjugada com FITC (1 µg/mL) em temperatura ambiente por 15 min, no escuro. Depois, os oócitos foram colocados em lâminas em gotas de 10 µL de *antifade* cobertas com lamínula e avaliados imediatamente em microscópio invertido de epifluorescência (IX51, Olympus, Tokyo, Japan; 20X; excitação de 404 nm e emissão de 526 nm).

Oócitos imaturos (vesícula germinativa - GV) foram classificados em quatro graus de acordo com a condensação da cromatina (GV0, GV1, GV2 e GV3), como descrito por Lodde *et al.* (2007). Os oócitos maduros foram classificados de acordo com o estadio de progressão da meiose como: imaturos (oócitos que ainda estavam em qualquer configuração de GV); intermediário (oócitos em metáfase I ou anáfase I); maduros (oócitos em telófase I ou metáfase II); e os oócitos que não estavam em nenhuma das configurações previamente descritas foram classificados como degenerados (DEG).

A dinâmica dos microfilamentos de actina (excitação de 495 nm e emissão de 517 nm) foi classificada em normal (N), descontínua (DC), difusa (DF) ou ausente (A), de acordo com Albarracín *et al.* (2005).

2.4 Quantificação do conteúdo lipídico intraoocitário

Os COC, imaturos, após a pré-MIV e após a MIV foram desnudados e os oócitos corados com a sonda lipofílica Nile Red, para avaliar o conteúdo intracelular de lipídios de acordo com metodologia previamente descrita, com algumas modificações (Genicot *et al.*, 2005). Os DO foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 1h em temperatura ambiente, lavados e transferidos para uma solução 1 µg/mL Nile Red por 30 min. Os oócitos foram lavados e incubados com Hoechst 33342 por 15 min, então foram lavados e colocados em lâminas com meio para fluorescência cobertas com lamínula. Foram obtidas imagens dos oócitos em um microscópio invertido equipado com epifluorescência (IX51; Olympus) e aumento de 20X. O comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente, foi de 515-575 nm e 560-680 nm para Nile Red e 330-385 nm e 520 nm para Hoechst 33342. A sonda Nile Red detecta lipídios neutros quando fluoresce em amarelo (580-596 nm) e lipídios polares quando fluoresce em laranja (597-620 nm), portanto, baseado nas condições da avaliação estabelecidas em nosso laboratório, somente os lipídios neutros foram detectados. A área e a intensidade de pixel dos oócitos foi avaliada pelo software ImageJ (1.49v). A intensidade de sinal do background foi subtraída do valor mensurado nos oócitos dos tratamentos. Para cada oócito, a intensidade de sinal do Nile Red corrigida pelo background foi normalizada pela área, para o cálculo das médias e erro padrão da média (EPM).

2.5 Avaliação da expansão das células do cumulus

A expansão das células do cumulus foi avaliada em oócitos imaturos (início do cultivo), após 8h de pré-maturação e após a MIV. O grau de expansão foi classificado seguindo um protocolo previamente descrito com pequenas modificações (Vanderhyden *et al.*, 1990). Foi feita uma classificação subjetiva em escore de 0 a 5, na qual 0 indica nenhuma expansão detectável e 5 indica o grau máximo de expansão.

2.6 Avaliação da funcionalidade das junções gap

A comunicação entre o oócito e as células do cumulus foi avaliada em oócitos imaturos (grupo Control_Immat) e após 8h de pré-maturação (grupos Control_PrelVM e EGFR-_PrelVM) através da microinjeção do corante fluorescente Lucifer Yellow (LY), como descrito por Luciano *et al.*, 2004. Em cada momento de avaliação os COC foram submetidos à injeção de uma solução à 3% de LY em 5 mM de cloreto de lítio e, a dispersão do corante pelas células do cumulus foi avaliada em microscópio invertido de fluorescência por 10 min após a injeção. A funcionalidade das junções gap foi classificada em abertas, parcialmente abertas e fechadas.

2.7 Extração do RNA e transcrição reversa

O RNA total foi extraído de células do cumulus isoladas de um *pool* de 20 COC com o RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante e incluindo o tratamento com DNase. A eluição foi feita em 20 µL de água DEPC. A concentração total do RNA foi avaliada pelo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a integridade do RNA foi avaliada utilizando o 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com o RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies).

A transcrição reversa (RT) do RNAm foi feita utilizando o High-Capacity cDNA reverse transcription kit com inibidor de RNase (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para cada 10 µL de RNAm foram adicionados 2 µL de 10X Reverse Transcription Buffer, 0,8 µL de 25X dNTPs, 2 µL de 10X random primers, 1 µL de MultScribe Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase inhibitor e 3,2 µL de água ultra-pura. A reação foi realizada no PRC200 DNA Engine Thermal Cyclers (MJ Research, CA, EUA) por 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C e 4°C até o final. As amostras de cDNA foram estocadas à -20°C até a análise de expressão gênica.

2.8 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A análise da expressão gênica nas células do cumulus foi realizada por um sistema de microfluídica em larga escala, Biomark HD (Fluidigm®, South San Francisco, CA, USA), utilizando Applied Biosystems™ TaqMan® Assays, específico para *Bos taurus* para avaliar a abundância de RNAm de 87 genes selecionados, incluindo os controles endógenos, demonstrados na Tabela 1.

Antes do RT-qPCR, cada amostra de RNA foi submetida à pré-amplificação com 1,25 µL assay mix (Taqman® Assay, concentração final de 0,2X para cada ensaio), 2,5 µL TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, #4391128) e 1,25 µL cDNA (5ng/µL). As reações foram ativadas à 95°C por 10 min seguida por desnaturação à 95°C por 15 s, *annealing* e amplificação à 60°C por 4 min em 14 ciclos. Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 7 vezes antes da análise de RT-qPCR.

Para a análise da expressão gênica, cada solução de amostra preparada consistia de 2,25 µL cDNA (produtos pré-amplificados), 2,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 0,25 µL de 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm); e a solução de ensaio foi 2,5 µL de 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) e 2,5 µL de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). O chip 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm) foi utilizado para coletar os dados. Depois de preparado, o chip foi carregado com 5 µL de cada solução de ensaio e 5 µL de cada solução de amostra. O ciclo térmico do qPCR foi realizado no Biomark HD System (Fluidigm) utilizando o protocolo TaqMan GE 96x96 Standard, que consistia em um estágio de Thermal Mix (50°C por 2 min, 70°C por 20 min e 25°C por 10 min) seguido de Hot Start (50°C por 2 min e 95°C por 10 min), seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 s), *annealing* e extensão do primer (60°C por 60 s).

A análise foi feita em quatro replicatas independentes e os valores de Ct foram calculados pelo software Biomark Real Time PCR (Fluidigm). O ensaio incluiu *beta actin* (ACTB), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), *peptidylprolyl isomerase A* (PPIA) e *ribossomal protein L15* (RPL15) como controles endógenos e, a estabilidade da abundância relativa dos transcritos foi analisada por ANOVA e pelo algoritmo GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Os controles

endógenos escolhidos neste estudo foram os genes mais estáveis (PPIA e RPL15), que não apresentaram diferença significativa entre os grupos por ANOVA e valor de M foi menor que 1,5. A média geométrica do Ct para os genes de referência foi calculada e, esse valor foi utilizado para calcular os valores de ΔCt (subtração da média geométrica do Ct dos genes de referência pelo Ct dos genes de interesse), os quais foram utilizados para a análise estatística. Os valores de ΔCt das amostras alvo foram normalizados pelas amostras controle para calcular o $\Delta\Delta Ct$, e os fold-changes, utilizados na representação gráfica, os quais foram calculados pela expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativo ao controle.

Tabela 1. Lista de genes bovinos avaliados por RT-qPCR neste estudo.

Símbolo do gene	Nome	ID (Thermo)
ACACA	Acetyl CoA carboxylase	Bt03213389_m1
ACTB	Actin, beta	Bt03279174_g1
ADCY3	Adenylate cyclase 3	Bt04289077_m1
ADCY6	Adenylate cyclase 6	Bt03816767_m1
ADCY9	Adenylate cyclase 9	Bt04287024_m1
AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	Bt03224587_g1
AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1, member B1	Bt03218049_g1
AREG	Amphiregulin	Bt03271014_m1
ATF4	Activating transcription factor 4	Bt03221057_m1
ATP5L	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex subunit G	Bt03210836_g1
BAX	BCL2-associated X protein	Bt03211777_g1
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bt04298952_m1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	Bt03287437_s1
BID	BH3 interacting domain death agonist	Bt03241255_m1
BMP15	Bone Morphogenetic Protein 15	Bt03286494_u1
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Bt03250954_g1
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	Bt04282453_m1
CAT	Catalase	Bt03228713_m1
CLIC3	Chloride intracellular channel 3	Bt03263038_m1
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	Bt03251320_g1
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	Bt03251320_g1
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	Bt03224737_m1
DNMT3A	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3A	Bt01027164_m1
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3B	Bt03259810_m1
EGFR	Epidermal growth factor - receptor	AJT96D7
FASN	Fatty acid synthase	Bt03210485_m1
FDX1	Ferredoxin 1	Bt03217449_m1
FOXO3	Forkhead box O3	Bt03649334_s1
FSHR	Follicle-stimulating hormone receptor	Bt03212674_m1
G6PD	Glucose 6 phosphate desidrogenase	Bt03649181_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Bt03210912_g1
GATM	Glycine amidinotransferase	Bt03237896_m1
GFPT2	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	Bt03250351_m1
GLRX2	Glutaredoxin 2	Bt03229700_m1
GPAT3	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	Bt04292093_m1
GPX1	Glutathione peroxidase 1	Bt03259217_g1
GREM1	Gremlin 1	Bt03255355_m1

<i>GUCY1B3</i>	Guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	Bt03215602_m1
<i>H2AFZ</i>	H2A histone family, member Z	Bt03216346_g1
<i>H3F3A</i>	H3 histone, family 3A	Bt03278804_g1
<i>H3F3B</i>	H3 histone, family 3B (H3.3B)	Bt04319377_g1
<i>HAS2</i>	Hyaluronan synthase 2	Bt03212695_g1
<i>HDAC2</i>	Histone deacetylase 2	Bt03244871_m1
<i>HSPA1A</i>	Heat shock 70kDa protein 1A	Bt03292670_g1
<i>IGF1R</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	Bt03649217_m1
<i>IGFBP2</i>	Insulin-like growth factor binding protein 2	Bt01040719_m1
<i>IMPDH1</i>	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 1	Bt00995384_m1
<i>IMPDH2</i>	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2	Bt03226238_g1
<i>KEAP1</i>	Kelch-like ECH-associated protein 1	Bt03817661_m1
<i>KRT8</i>	Keratin 8	Bt03225178_g1
<i>LUM</i>	Lumican	Bt03211920_m1
<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase	Bt03216718_g1
<i>MTIF3</i>	Mitochondrial translational initiation factor 3	Bt03231844_m1
<i>NDUFA1</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A1	Bt03216720_g1
<i>NOS2</i>	Nitric oxide synthase 2, inducible	Bt03249597_m1
<i>NOS3</i>	Nitric oxide synthase 3	Bt03217679_m1
<i>NPPC</i>	Natriuretic peptide C (CNP)	Bt03212844_m1
<i>NPR1</i>	Natriuretic peptide receptor 1	Bt04297034_g1
<i>NPR2</i>	Natriuretic peptide receptor 2	Bt04316732_m1
<i>NPR3</i>	Natriuretic peptide receptor 3	Bt03212867_m1
<i>OOSP1</i>	Oocyte-secreted protein 1	Bt03233533_g1
<i>PDE5A</i>	Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	Bt03214261_m1
<i>PFKP</i>	Phosphofructokinase	Bt04316551_m1
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	Bt03225854_mH
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1 (OCT4)	Bt03223846_g1
<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Bt03220821_m1
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A	Bt03224617_g1
<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin-1	Bt03223684_m1
<i>PRDX3</i>	Peroxiredoxin 3	Bt03214402_m1
<i>PRKCD</i>	Protein kinase C delta	Bt03224587_g1
<i>PTGS2/COX2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Bt03214489_m1
<i>PTX3</i>	Pentraxin 3, long	Bt03249011_m1
<i>RGS2</i>	Regulator of G-protein signaling 2	Bt03246656_g1
<i>RPL15</i>	Ribosomal protein L15	Bt03288449_g1
<i>S100A10</i>	S100 calcium binding protein A10	Bt03215645_m1
<i>S100A14</i>	S100 calcium binding protein A14	Bt03230771_g1
<i>SLC2A1</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Bt03215314_m1
<i>SLC2A3</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	Bt03259514_g1
<i>SLC2A4</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Bt03215316_m1
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble	Bt03215423_g1
<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	Bt03259871_g1
<i>TFAM</i>	Transcription factor A, mitochondrial	Bt03260078_m1
<i>TNFAIP6</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Bt03210223_m1
<i>TNFRSF21</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	Bt03250597_m1
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	Bt03223213_m1
<i>VCAN</i>	Versican	Bt03217633_m1
<i>XPB1</i>	X-box binding protein 1	Bt03227621_g1

2.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes em replicatas independentes. Em cada replicata, a taxa de maturação nuclear e distribuição dos microfilamentos de actina foram calculadas como porcentagem do total de COC submetidos à MIV. Quando foi preciso normalizar a distribuição dos dados, as porcentagens foram transformadas por arco-seno. A expressão gênica relativa foi analisada após o cálculo do ΔC_t e transformada em logaritmo quando necessário. A normalidade dos resíduos foi testada por Shapiro-Wilk's.

A análise dos dados de maturação nuclear, distribuição dos microfilamentos de actina, expansão das células do cumulus e conteúdo lipídico nos oócitos e expressão gênica nas células do cumulus foi feita por one-way ANOVA seguida do teste de Tukey ou pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's, de acordo com a distribuição dos dados. As análises foram feitas utilizando o software Prism (version 7.0, GraphPad Software, Inc). A funcionalidade das junções gap foi avaliada pelo teste de qui-quadrado utilizando o software GraphPad InStat.

As diferenças entre os tratamentos com $P < 0,05$ foram consideradas significativas. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

A regressão linear foi utilizada para avaliar as mudanças ao longo do tempo em relação à maturação nuclear e ao conteúdo lipídico. Além disso, em cada tempo, as médias foram comparadas pelo teste de t ou Mann Whitney, de acordo com a distribuição dos dados, utilizando o software Prism (versão 7.0, GraphPad Software, Inc). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Diferenças entre os tratamentos com $P < 0,05$ e r^2 próximo de 1 foram consideradas significativas.

3 Resultados

3.1 Maturação nuclear

As configurações da cromatina ao final do cultivo de pré-maturação estão apresentadas na Tabela 2. A maioria dos oócitos imaturos avaliados imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat) estavam em GV (86,8%), e a principal categoria foi GV1 ($67.6 \pm 5.2\%$). Da mesma forma, a maioria dos oócitos pré-maturados com AG1478 por 8h (EGFR-_PreIVM) estavam bloqueados em GV (53,1%), e a maior parte deles estava em GV1 ($42.9 \pm 7.2\%$, sem diferença para os outros tratamentos; $P > 0,05$) ou em GV3 [$28.6 \pm 3.8\%$, semelhante ao grupo Control_Immat ($12.4 \pm 3.5\%$; $P > 0,05$) e menor que o grupo Control_PreIVM ($52.1 \pm 7.1\%$; $P < 0,05$)]. Porém, poucos oócitos maturados por 8h (Control_PreIVM) permaneceram bloqueados em GV (32,4%), com a maioria progredindo para GV3 ($52.1 \pm 7.1\%$). Não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos nas categorias de GV0, GV2 e DEG. As maiores taxas de MI foram encontradas no grupo Control_PreIVM ($15.5 \pm 6.2\%$) diferindo ($P < 0,05$) do grupo Control_Immat ($0.0 \pm 0.0\%$), mas nenhum deles diferiu ($P > 0,05$) do grupo EGFR-_PreIVM ($9.5 \pm 4.5\%$).

Após a MIV (Tabela 3), não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos nas taxas de MII (conclusão da meiose), porém, as taxas de oócitos DEG do grupo Control_IMV_30h ($9.1 \pm 1.7\%$) foram maiores ($P < 0,05$) que do grupo EGFR-_IVM ($2.3 \pm 0.8\%$).

Para avaliar a cinética do remodelamento da cromatina durante a pré-maturação, nós avaliamos os oócitos a cada 2h. A análise de regressão linear (Figura 2) demonstrou uma diminuição na porcentagem de oócitos em GV1 ao longo do tempo, correspondente com o aumento da porcentagem de oócitos em GV3, para os grupos Control_PreIVM e EGFR-_PreIVM ($P < 0,05$). Uma distinção clara entre os tratamentos pode ser visualizada com 4h de cultivo para as categorias GV1 e GV3, o que indica um retardo na progressão da meiose no grupo EGFR-_PreIVM.

Tabela 2. Efeitos da pré-maturação de oócitos bovinos com inibidor do EGFR na maturação nuclear

Grupo*	Oócitos (N)	Tempo de cultivo	Configuração da cromatina (%)					
			GV0	GV1	GV2	GV3	MI	DEG
Control_Immat		0	7.4±4.1 ^a	67.6±5.2 ^a	12.3±3.7 ^a	12.4±3.5 ^b	0.0±0.0 ^b	0.4±0.4 ^a
Control_PrelVM		8	3.5±1.3 ^a	20.7±4.2 ^b	8.2±2.0 ^a	52.1±7.1 ^a	15.5±6.2 ^a	0.0±0.0 ^a
EGFR- PrelVM		8	9.1±3.9 ^a	42.9±7.2 ^{ab}	9.5±2.1 ^a	28.6±3.8 ^b	9.5±4.5 ^{ab}	0.4±0.4 ^a

*Oócitos foram avaliados imediatamente após a remoção do folículo (grupo Control_Immat), após 8h MIV (grupo Control_PrelVM) e após 8h de pré-maturação com o inibidor do EGFR AG1478 (grupo EGFR- PrelVM). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 11 replicatas. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

Tabela 3. Efeitos da pré-maturação de oócitos bovinos com inibidor do EGFR, seguido de MIV na maturação nuclear

Grupo*	Oócitos (N)	Tempo de cultivo			Estadio da meiose (%)			
		PreMIV	MIV	Total	GV	Int.	MII	DEG
Control_IVM_22h		0	22	22	2.6±1.0 ^a	17.6±3.3 ^a	75.6±3.3 ^a	4.1±1.1 ^{ab}
Control_IVM_30h		0	30	30	0.0±0.0 ^a	12.1±3.5 ^a	78.7±3.6 ^a	9.1±1.7 ^a
EGFR- IVM		8	22	30	1.1±0.6 ^a	12.9±2.1 ^a	83.7±1.9 ^a	2.3±0.8 ^b

*Oócitos foram avaliados após 22h MIV (grupo Control_IVM_22h), 30 h MIV (grupo Control_IVM_30h) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (grupo EGFR- IVM). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 11 replicatas. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05).

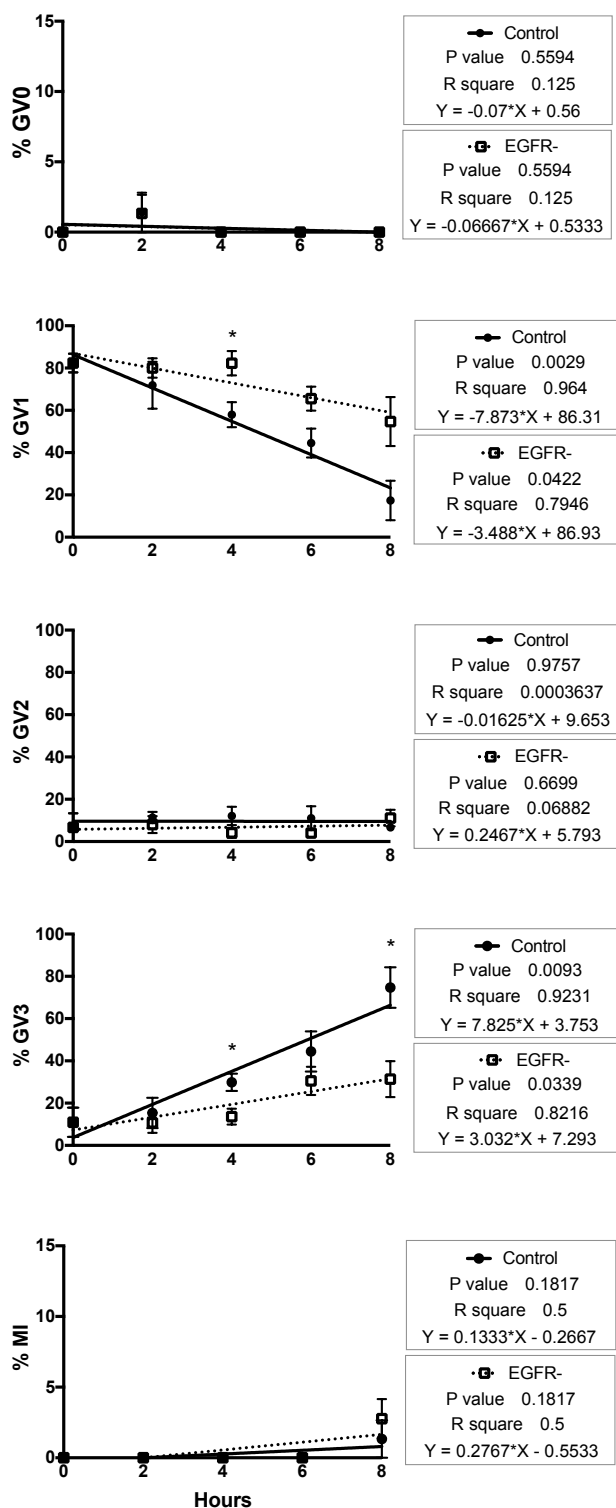


Figura 2. Regressão linear da cinética da remodelação da cromatina durante a pré-maturação com inibidor do EGFR em oócitos bovinos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 4 replicatas. * Asteriscos acima de tempos específicos indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$; teste t ou teste de Mann Whitney).

3.2 Expansão das células do cumulus

A expansão das células do cumulus foi inibida durante a pré-maturação, o grupo EGFR-_PreIVM apresentou menor grau de expansão em comparação com o grupo Control_PreIVM ao final do cultivo de pré-maturação (Figura 3A). No entanto, ambos os grupos Control_IVM e EGFR-_IVM exibiram o grau máximo de expansão ao final da MIV (Figura 3B).

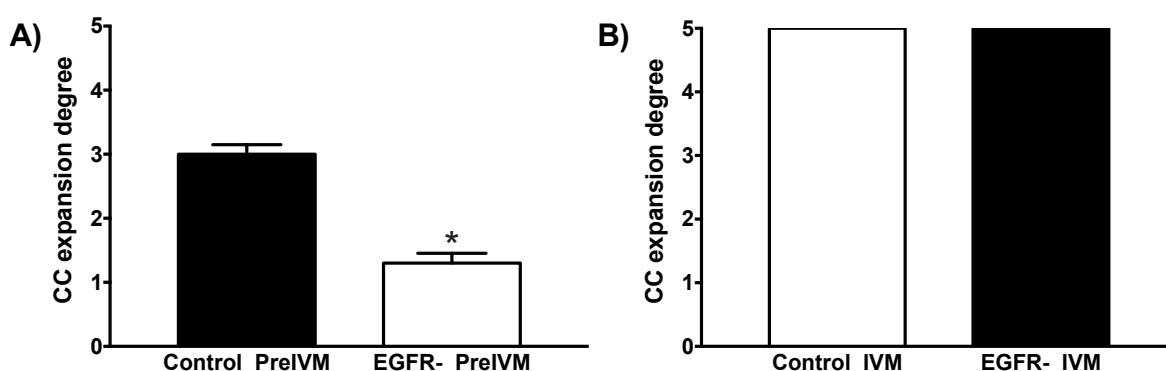


Figura 3. Grau de expansão das células do cumulus (CC) de COC bovinos. (A) COC avaliados após 8h de MIV (grupo Control_PreIVM) e após 8h de pré-maturação com o inibidor do EGFR AG1478 (grupo EGFR-_PreIVM). (B) COC avaliados após 22h MIV (grupo Control_IVM_22h) e após 8h de pré-maturação com o inibidor do EGFR AG1478 seguida de 22h de MIV (grupo EGFR-_IVM). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 4 replicatas. * Asteriscos acima das barras indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

3.3 Funcionalidade das junções gap

A funcionalidade das junções gap está apresentada na Tabela 4. O cultivo de pré-maturação foi eficaz em manter as junções gap abertas em 85,7% dos oócitos do grupo EGFR-_PreIVM, apresentando taxas semelhantes ($P > 0,05$) ao grupo Control_Immat (88,9%), ao passo que os oócitos do grupo Control_PreIVM apresentaram menor ($P < 0,05$) taxa de oócitos com as junções gap abertas (35,7%). Estes oócitos do grupo Control_PreIVM apresentaram maiores taxas de oócitos com

as junções parcialmente abertas (42,9%), diferindo ($P<0,05$) dos grupos Control_Immat (0%) e EGFR-_PreIVM (0%).

Tabela 4. Efeitos da pré-maturação de oócitos bovinos com inibidor do EGFR na funcionalidade das junções gap

Grupo*	Tempo de cultivo (h)	Oócitos (N)	Funcionalidade das junções gap		
			Abertas N (%)	Parcialmente abertas N (%)	Fechadas N (%)
Control_Immat	0	9	8 (88,9%) ^a	0 (0%) ^a	1 (11,1%) ^a
Control_PreIVM	8	14	5 (35,7%) ^b	6 (42,9%) ^b	3 (21,4%) ^a
EGFR-_PreIVM	8	14	12 (85,7%) ^a	0 (0%) ^a	2 (14,3%) ^a

*Oócitos foram avaliados imediatamente após a remoção do folículo (grupo Control_Immat), após 8h MIV (grupo Control_PreIVM) e após 8h de pré-maturação com o inibidor do EGFR AG1478 (grupo EGFR-_PreIVM). Letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de qui-quadrado ($P<0,05$).

3.4 Distribuição dos microfilamentos

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) na distribuição dos microfilamentos de actina nos oócitos. A maior parte dos oócitos apresentou distribuição normal dos microfilamentos em todos os grupos após a pré-maturação e após a MIV (Tabela 4).

Tabela 5. Efeitos da pré-maturação de oócitos bovinos com inibidor do EGFR na distribuição dos microfilamentos de actina

Grupo*	Tempo de cultivo			Distribuição dos microfilamentos (%)			
	PréMIV	MIV	Total	Normal	Descontínua	Difusa	Ausente
PréMIV							
Control_Immat	0	0	0	75.2±12.1	21.5±9.4	3.3±3.3	0
Control_PreIVM	0	8	8	69.3±4.6	23.6±5.7	5.1±3.1	1.9±1.9
EGFR-_PreIVM	8	0	8	84.7±9.1	13.0±9.2	0	2.2±1.4
PréMIV seguida de MIV							
Control_IVM	0	22	22	81.6±6.7	11.1±6.1	4.3±2.9	2.9±2.0
Control_IVM	0	30	30	86.6±3.6	11.1±2.8	1.3±1.3	0.9±0.9
EGFR-_IVM	8	22	30	87.3±2.9	8.7±2.7	1.0±1.0	2.9±1.2

*Oócitos foram avaliados imediatamente após a remoção do folículo (grupo Control_Immat), após 8h MIV (grupo Control_PreIVM), após 8h de pré-maturação com o inibidor do EGFR AG1478 (grupo EGFR-_PreIVM). Após a pré-maturação os oócitos foram submetidos à MIV e avaliados após 22h MIV (Control_IVM_22h), 30h MIV (Control_IVM_30h) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (grupo EGFR-_IVM). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 5 replicatas. Não houveram diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

3.5 Quantificação de lipídios com Nile Red

Como as taxas de oócitos degenerados foi maior no grupo Control_IMV_30h comparado com o grupo EGFR_IVM (Tabela 3), este grupo não foi incluído nas avaliações subsequentes. Após a pré-maturação, o conteúdo lipídico intracelular dos oócitos do grupo EGFR_PrelVM foi significativamente menor ($P<0,05$) em comparação com o grupo Control_Immat, e não diferiu ($P>0,05$) do grupo Control_PrelVM (Figura 4A). No entanto, após a MIV, o conteúdo lipídico foi maior ($P<0,05$) em oócitos do grupo EGFR_IVM comparado com Control_IVM (Figura 4B).

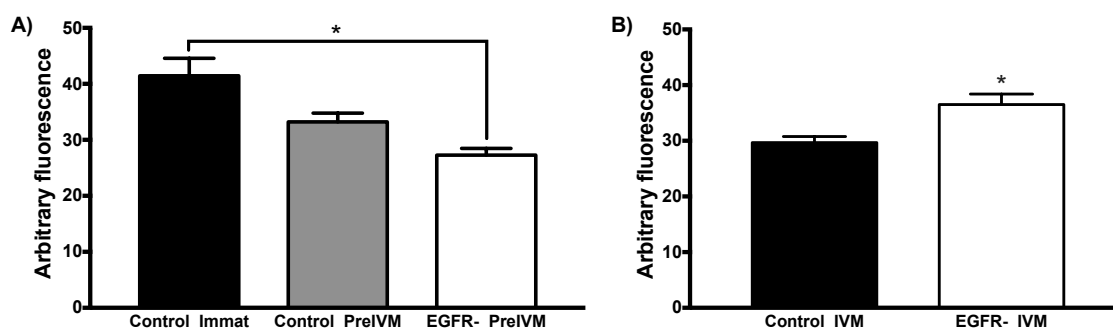


Figura 4. Efeitos da pré-maturação com inibidor do EGFR seguida de MIV no conteúdo lipídico de oócitos bovinos. Oócitos avaliados imediatamente após sua remoção do folículo (Control_Immat), após 8h de MIV (grupo Control_PrelVM) e após 8h de pré-maturação com inibidor do EGFR (grupo EGFR_PrelVM). (B) COC avaliados após 22h MIV (grupo Control_IVM_22h) e após 8h de pré-maturação com o inibidor do EGFR seguida de 22h de MIV (grupo EGFR_IVM). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 4 replicatas. * Asteriscos acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,05$).

A regressão linear foi utilizada para avaliar as variações no conteúdo lipídico intracelular nos oócitos durante a pré-maturação (Figura 5). Não foram observadas variações no grupo Control_PrelVM ($P>0,05$); no entanto, foi verificado um decréscimo no conteúdo lipídico nos oócitos do grupo EGFR_PrelVM ($P<0,05$).

Como a macromolécula adicionada ao meio de pré-maturação foi o BSA e ao meio de MIV foi o FCS, um experimento foi realizado para avaliar se essas alterações no conteúdo lipídico observadas entre os tratamentos são devidas às diferentes macromoléculas. Então, observamos uma redução ($P<0,05$) no conteúdo lipídico dos oócitos do grupo EGFR_PrelVM em comparação com oócitos MIV em

meio suplementado com BSA (grupo Control_PreIVM_BSA); no entanto, nenhum destes grupos difere ($P>0,05$) do grupo de oócitos MIV suplementados com FCS (Control_PreIVM_FCS). Estes resultados estão apresentados na Figura 6.

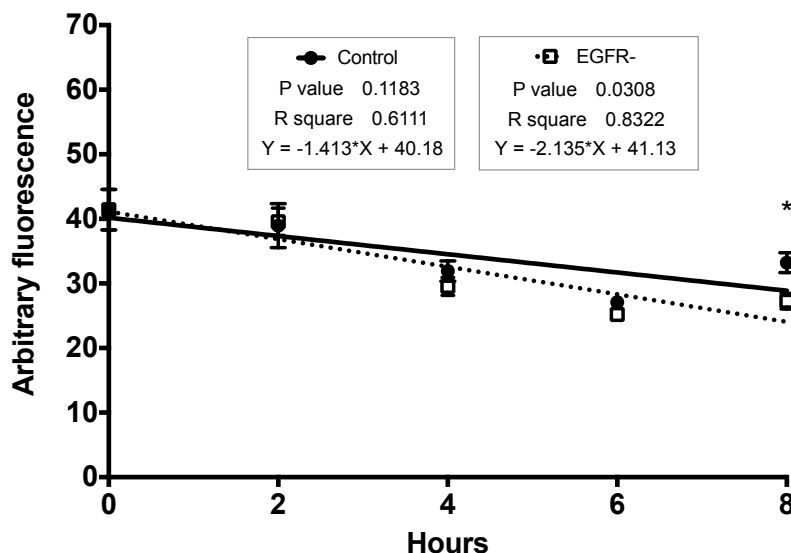


Figura 5. Análise de regressão linear do conteúdo lipídico intracelular (em unidades arbitrárias de fluorescência) de oócitos bovinos pré-maturados com inibidor do EGFR por até 8h. Em cada momento de avaliação, os tratamentos foram comparados pelo teste de Mann Whitney e os asteriscos acima dos pontos indicam diferença significativa ($P<0,05$). Os dados estão apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência e são as médias de 4 repetições.

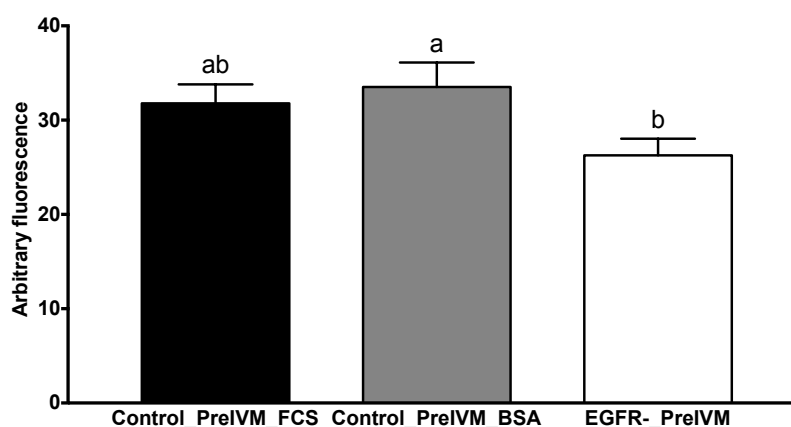


Figura 6. Conteúdo lipídico intracelular em oócitos bovinos pré-maturados por 8h com inibidor do EGFR e albumina sérica bovina (grupo EGFR-_PreIVM) ou maturados por 8h em meio suplementado com soro fetal bovino (grupo Control_PreIVM_FCS) ou albumina sérica bovina (grupo Control_PreIVM_BSA). Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 4 repetições. Letras distintas acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,05$).

3.6 Abundância relativa de transcritos nas células do cumulus

A abundância relativa de transcritos de 82 genes alvo avaliados neste estudo estão apresentadas na Tabela 5 em ΔCt . Além disso, os genes diferencialmente expressos também estão apresentados como *fold-change* relativo ao grupo Control_Immat, como detalhado acima. Os genes relacionados à maturação oocitária estão apresentados na Figura 7 [*Adenylate cyclase 3 (ADCY3)*, *Adenylate cyclase 6 (ADCY6)*, *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, *Epidermal growth factor - receptor (EGFR)*, *Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR)*, *Guanylate cyclase 1 soluble beta 3 (GUCY1B3)*, *Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 1 (IMPDH1)*, *Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2)*, *Mitogen-activated protein kinase (MAPK1)*, *Nitric oxide synthase 2 (NOS2)*, *Nitric oxide synthase 3 (NOS3)*, *Natriuretic peptide receptor 2 (NPR2)*, *Natriuretic peptide receptor 3 (NPR3)*, *Phosphodiesterase 5A (PDE5A)*, *Protein kinase C delta (PRKCD)*, *Regulator of G-protein signaling 2 (RGS2)*, *Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)*]. Ao final da pré-maturação a expressão relativa diferiu ($P < 0,05$) em 3 dos 23 genes investigados (3 genes, *BDNF*, *EGFR* e *PRKCD* estavam *upregulated* comparando os grupos Control_Immat vs EGFR-PreIMV). No entanto, ao final da MIV, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os Control_IVM e EGFR-IVM.

Os genes de expansão das células do cumulus estão apresentados na Figura 8 [*Gremlin 1 (GREM1)*, *Hyaluronan synthase 2 (HAS2)*, *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2/COX2)*, *Pentraxin 3 (PTX3)*, *Tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFA1P6)*]. Ao final da pré-maturação, *GREM1* estava *upregulated* ($P < 0,05$) quando comparados os grupos Control_Immat vs EGFR-PreIMV e, ao final da MIV, *PTGS2/COX2*, foi *upregulated* ($P < 0,05$) no grupo EGFR-IVM comparado com Control_IVM.

Os genes de metabolismo estão apresentados na Figura 9 [*Glycine amidinotransferase (GATM)*, *Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (SLC2A1)*, *Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 (SLC2A3)*, *Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (SLC2A4)*]. *SLC2A3* estava *downregulated* ($P < 0,05$) após a pré-maturação no grupo EGFR-PreIVM, enquanto que ao final da MIV, o *GATM* estava *upregulated*

($P < 0,05$) no grupo EGFR_IVM. Os genes do metabolismo lipídico estão apresentados na Figura 9 [*Fatty acid synthase (FASN)*, *Ferredoxin 1 (FDX1)*, *Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 (GPAT3)*], *GPAT3* estava *upregulated* ($P < 0,05$) no grupo EGFR_PreIVM comparado com Control_Immat. O gene do metabolismo da glicose está apresentado na Figura 9 [*Aldo-keto reductase family 1 member B1 (AKR1B1)*] e não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Os genes relacionados à qualidade embrionária estão apresentados na Figura 10 [*Chloride intracellular channel 3 (CLIC3)*, *Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)*, *Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)*, *Lumican (LUM)*, *POU class 5 homeobox 1 (POU5F1)*]. Após a pré-maturação, *CLIC3* e *POU5F1* estavam *downregulated* enquanto que *IGF1R* e *LUM* estavam *upregulated* no grupo EGFR_PreIVM ($P < 0,05$). Após a MIV, *LUM* estava *upregulated* no grupo EGFR_IVM ($P < 0,05$). O gene de desenvolvimento embrionário está apresentado na Figura 10 [*S100 calcium binding protein A14 (S100A14)*] e estava *downregulated* após a pré-maturação no grupo EGFR_PreIVM ($P < 0,05$). Os genes relacionados à regulação epigenética estão apresentados na Figura 10 [*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 (Dnmt1)*, *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3B (Dnmt3B)*, *H3 histone family 3B (H3F3B)*], o *H3F3B* estava *downregulated* após a pré-maturação no grupo EGFR_PreIVM ($P < 0,05$).

Os genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático estão apresentados na Figura 11 [*Activating transcription factor 4 (ATF4)*, *DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3)*, *X-box binding protein 1 (XBP1)*], nós observamos a *downregulation* ($P < 0,05$) na expressão de todos estes genes após a pré-maturação no grupo EGFR_PreIVM. Os genes relacionados ao estresse oxidativo estão apresentados na Figura 11 [*Follicle-stimulating hormone receptor (FOXO3)*, *Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 (GFPT2)*, *Glutaredoxin 2 (GLRX2)*] e não apresentaram diferenças entre os grupos ($P > 0,05$) após a pré-maturação e após a MIV. Os genes de defesa antioxidante estão apresentados na Figura 11 [*Glutathione peroxidase 1 (GPX1)*, *Heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A)*], ambos estavam *downregulated* após a pré-maturação no grupo EGFR_PreIVM ($P < 0,05$). Os genes de apoptose estão apresentados na Figura 11 [*BCL2-associated X protein (BAX)*, *B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)*, *Caspase 3 apoptosis-related cysteine peptidase (CASP3)*, *Caspase 9 apoptosis-related cysteine peptidase (CASP9)*],

Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21 (TNFRS21)], apenas o TNFRS21 estava upregulated no grupo EGFR-PreIVM após a pré-maturação.

Tabela 6. Expressão gênica relativa (ΔCt) de células do cumulus bovinas derivadas de oócitos imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat), após 8h de pré-maturação com AG1478 (EGFR-PreIVM), após 22h de MIV (Control_IVM) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (EGFR-IVM)

Gene	Grupo			
	Control_Immat	EGFR-PreIVM	Control_IVM	EGFR-IVM
Defesa antioxidante				
CAT	1.85±0.11	2.73±0.15	2.78±0.45	2.86±0.27
GPX1	-2.50±0.10 ^b	-1.42±0.19 ^a	-0.99±0.31 ^a	-1.20±0.16 ^a
HSPA1A	-0.10±0.25 ^b	4.37±0.18 ^a	4.22±0.56 ^a	3.69±0.35 ^{ab}
Apoptose				
BAX	2.07±0.18 ^a	2.07±0.08 ^a	1.14±0.31 ^b	1.49±0.20 ^{ab}
BCL2	11.69±0.48 ^a	9.58±0.41 ^{ab}	1.36±0.28 ^b	1.87±0.28 ^{ab}
BID	3.97±0.19	4.20±0.11	4.54±0.26	4.52±0.28
CASP3	5.35±0.06 ^a	4.85±0.05 ^{ab}	4.33±0.22 ^b	4.47±0.10 ^b
CASP9	4.32±0.09 ^a	4.06±0.10 ^{ab}	3.67±0.26 ^b	3.42±0.13 ^b
TNFRSF21	4.50±0.35 ^a	2.33±0.26 ^b	-0.54±0.20 ^c	0.09±0.29 ^c
TP53	3.49±0.10	3.10±0.18	3.67±0.30	3.57±0.21
Expansão das células do cumulus				
GREM1	5.60±0.34 ^a	2.10±0.21 ^b	5.96±0.65 ^a	6.58±0.00 ^a
HAS2	8.55±0.53 ^a	2.63±0.21 ^{ab}	-0.52±0.30 ^b	-0.37±0.18 ^b
PTGS2/COX2	7.06±0.04 ^a	6.45±0.07 ^a	4.14±0.27 ^b	2.52±0.30 ^c
PTX3	8.06±1.36 ^a	2.98±0.20 ^{ab}	1.77±0.28 ^{ab}	-0.46±0.30 ^b
TNFAIP6	9.16±1.50 ^a	4.99±0.16 ^{ab}	-2.49±0.31 ^b	-2.84±0.53 ^b
VCAN	-1.78±0.12	-3.55±0.22	-3.63±0.37	-3.71±0.12
Desenvolvimento embrionário				
S100A10	1.04±0.13	1.74±0.12	1.11±0.39	0.92±0.07
S100A14	2.18±0.18 ^b	3.63±0.05 ^a	2.93±0.38 ^{ab}	3.75±0.39 ^a
Estresse do retículo endoplasmático				
ATF4	1.24±0.23 ^b	2.18±0.14 ^a	1.85±0.24 ^{ab}	1.33±0.17 ^b
DDIT3	3.18±0.20 ^b	4.95±0.24 ^a	3.30±0.30 ^b	3.26±0.36 ^b
XBP1	1.13±0.10 ^b	2.40±0.11 ^a	0.76±0.39 ^b	1.04±0.25 ^b
Regulação epigenética				
Dnmt1	2.11±0.09 ^b	2.61±0.17 ^{ab}	2.75±0.17 ^{ab}	2.89±0.20 ^a
Dnmt3A	2.78±0.12	2.68±0.19	2.93±0.20	2.62±0.15
Dnmt3B	6.26±0.16 ^c	6.61±0.25 ^{bc}	7.61±0.22 ^a	7.27±0.28 ^{ab}
H2AFZ	-0.13±0.18	-0.76±0.27	-0.54±0.33	-0.13±0.22
H3F3A	3.05±0.43	2.60±0.11	2.62±0.24	2.33±0.14
H3F3B	-2.15±0.27 ^c	0.65±0.19 ^a	-0.41±0.27 ^b	-0.43±0.13 ^b
HDAC2	1.92±0.17	1.62±0.15	1.14±0.30	1.10±0.16
Metabolismo de glicose				
AKR1B1	-1.02±0.09 ^b	-0.22±0.13 ^b	1.68±0.32 ^a	1.92±0.18 ^a
PFKP	1.00±0.18	1.55±0.06	0.83±0.20	1.45±0.23
PGK1	-0.10±0.22	0.67±0.13	-0.14±0.25	0.12±0.27
Metabolismo lipídico				
ACACA	3.80±0.22	3.34±0.20	3.38±0.31	3.39±0.27
AGPAT1	0.65±0.14	0.67±0.12	0.03±0.31	0.13±0.12
FASN	0.21±0.11 ^b	0.19±0.06 ^b	1.30±0.32 ^a	0.91±0.16 ^{ab}
FDX1	3.88±0.19 ^a	3.62±0.16 ^{ac}	2.64±0.41 ^{bc}	2.37±0.17 ^b
GPAT3	2.81±0.19 ^a	1.86±0.23 ^b	0.84±0.27 ^c	0.78±0.19 ^c
PPARA	3.91±0.20	4.26±0.14	3.91±0.40	4.04±0.18

Metabolismo				
<i>ATP5L</i>	-0.44±0.12	-0.34±0.15	-0.48±0.35	-0.30±0.25
<i>G6PD</i>	1.53±0.07	0.89±0.14	1.11±0.33	1.13±0.15
<i>GATM</i>	2.79±0.12 ^c	2.07±0.20 ^c	4.96±0.36 ^a	3.81±0.11 ^b
<i>MTIF3</i>	5.49±0.12	5.59±0.27	5.83±0.23	5.83±0.29
<i>SLC2A1</i>	0.13±0.18 ^{ab}	0.56±0.19 ^a	-0.98±0.22 ^b	-0.57±0.54 ^{ab}
<i>SLC2A3</i>	-1.54±0.21 ^b	2.50±0.35 ^a	-0.02±0.47 ^{ab}	0.87±1.32 ^{ab}
<i>SLC2A4</i>	11.50±0.56 ^a	9.97±0.36 ^{ab}	5.35±0.22 ^b	5.70±0.33 ^{ab}
Maturação oocitária				
<i>ADCY3</i>	3.95±0.13 ^c	4.65±0.10 ^{bc}	5.54±0.23 ^a	5.04±0.23 ^{ab}
<i>ADCY6</i>	2.22±0.08 ^a	2.47±0.20 ^a	1.67±0.32 ^{ab}	1.00±0.23 ^b
<i>ADCY9</i>	3.32±0.20	3.60±0.20	4.10±0.28	3.71±0.13
<i>AREG</i>	14.40±0.08	9.04±0.52	9.10±0.33	8.32±0.38
<i>BDNF</i>	10.50±0.93 ^a	5.41±0.25 ^b	6.89±0.34 ^b	5.40±0.60 ^b
<i>BMP15</i>	7.06±0.94	7.29±1.13	10.90±0.39	8.68±1.41
<i>EGFR</i>	1.33±0.11 ^b	0.34±0.06 ^c	2.43±0.19 ^a	2.05±0.10 ^a
<i>FSHR</i>	1.32±0.04 ^b	2.10±0.11 ^{ab}	8.32±0.32 ^a	7.29±0.18 ^{ab}
<i>GUCY1B3</i>	5.61±0.12 ^b	6.58±0.29 ^{ab}	6.52±0.37 ^{ab}	6.91±0.31 ^a
<i>IMPDH1</i>	3.72±0.17 ^b	4.00±0.05 ^b	5.17±0.24 ^a	5.18±0.21 ^a
<i>IMPDH2</i>	1.28±0.09 ^b	1.64±0.15 ^b	2.60±0.17 ^a	2.63±0.15 ^a
<i>MAPK1</i>	2.46±0.16 ^a	1.99±0.20 ^{ab}	0.96±0.26 ^c	1.25±0.13 ^{bc}
<i>NOS2</i>	0.35±0.06 ^b	2.50±0.22 ^{ab}	5.54±0.21 ^a	5.42±0.26 ^a
<i>NOS3</i>	6.98±0.10 ^a	6.17±0.21 ^{ab}	5.61±0.36 ^{bc}	5.03±0.28 ^c
<i>NPPC</i>	10.80±1.10	11.30±0.48	9.28±0.32	9.79±0.47
<i>NPR1</i>	8.69±0.26	9.55±0.29	8.41±0.57	8.12±0.37
<i>NPR2</i>	2.80±0.16 ^c	3.19±0.11 ^{bc}	4.33±0.38 ^a	3.92±0.27 ^{ab}
<i>NPR3</i>	3.18±0.16 ^b	3.70±0.11 ^{ab}	8.23±0.20 ^a	8.01±0.12 ^a
<i>OOSP1</i>	8.98±1.19	8.12±1.28	7.87±0.25	7.51±0.78
<i>PDE5A</i>	10.40±0.72 ^a	2.76±0.37 ^{ab}	1.91±0.35 ^b	2.92±0.21 ^{ab}
<i>PRKCD</i>	6.14±0.16 ^a	5.07±0.17 ^b	4.77±0.30 ^b	4.79±0.23 ^b
<i>RGS2</i>	7.62±0.98 ^a	8.79±1.23 ^a	0.44±0.41 ^b	-0.10±0.08 ^b
<i>STAT3</i>	3.52±0.14 ^a	2.87±0.15 ^{ab}	2.17±0.25 ^{bc}	1.91±0.16 ^c
Estresse oxidativo				
<i>FOXO3</i>	4.15±0.09 ^a	4.25±0.07 ^a	3.98±0.34 ^{ab}	3.31±0.15 ^b
<i>GFPT2</i>	8.54±0.34 ^a	5.85±0.22 ^{ab}	-0.32±0.29 ^b	-0.27±0.26 ^b
<i>GLRX2</i>	3.40±0.09 ^a	2.95±0.16 ^a	1.68±0.26 ^b	1.79±0.24 ^b
<i>KEAP1</i>	2.06±0.10	2.15±0.19	1.84±0.31	1.83±0.17
<i>SOD1</i>	0.60±0.13	0.90±0.17	0.99±0.40	1.03±0.11
<i>TFAM</i>	4.94±0.19	4.40±0.30	4.27±0.28	4.12±0.16
Qualidade embrionária				
<i>CLIC3</i>	2.76±0.29 ^c	6.12±0.42 ^b	9.82±0.26 ^a	9.82±0.26 ^a
<i>IGF1R</i>	0.08±0.07 ^a	-1.28±0.15 ^b	-0.12±0.32 ^a	-0.39±0.18 ^a
<i>IGFBP2</i>	2.43±0.12 ^b	2.43±0.16 ^b	5.05±0.46 ^a	4.15±0.21 ^a
<i>KRT8</i>	2.98±0.14	1.55±0.21	1.64±0.15	2.44±0.65
<i>LUM</i>	5.73±0.10 ^a	4.28±0.25 ^b	2.34±0.29 ^c	0.46±0.44 ^d
<i>NDUFA1</i>	2.50±0.67	2.33±0.56	2.08±0.39	3.74±0.92
<i>POU5F1</i>	2.71±0.21 ^b	3.87±0.29 ^a	4.43±0.19 ^a	4.23±0.18 ^a
<i>PRDX1</i>	0.22±0.16	0.76±0.21	0.21±0.35	0.33±0.16
<i>PRDX3</i>	2.90±0.15	4.02±0.24	2.93±0.57	3.41±0.31

Os dados estão apresentados como média ± EPM de 4 repetições. Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

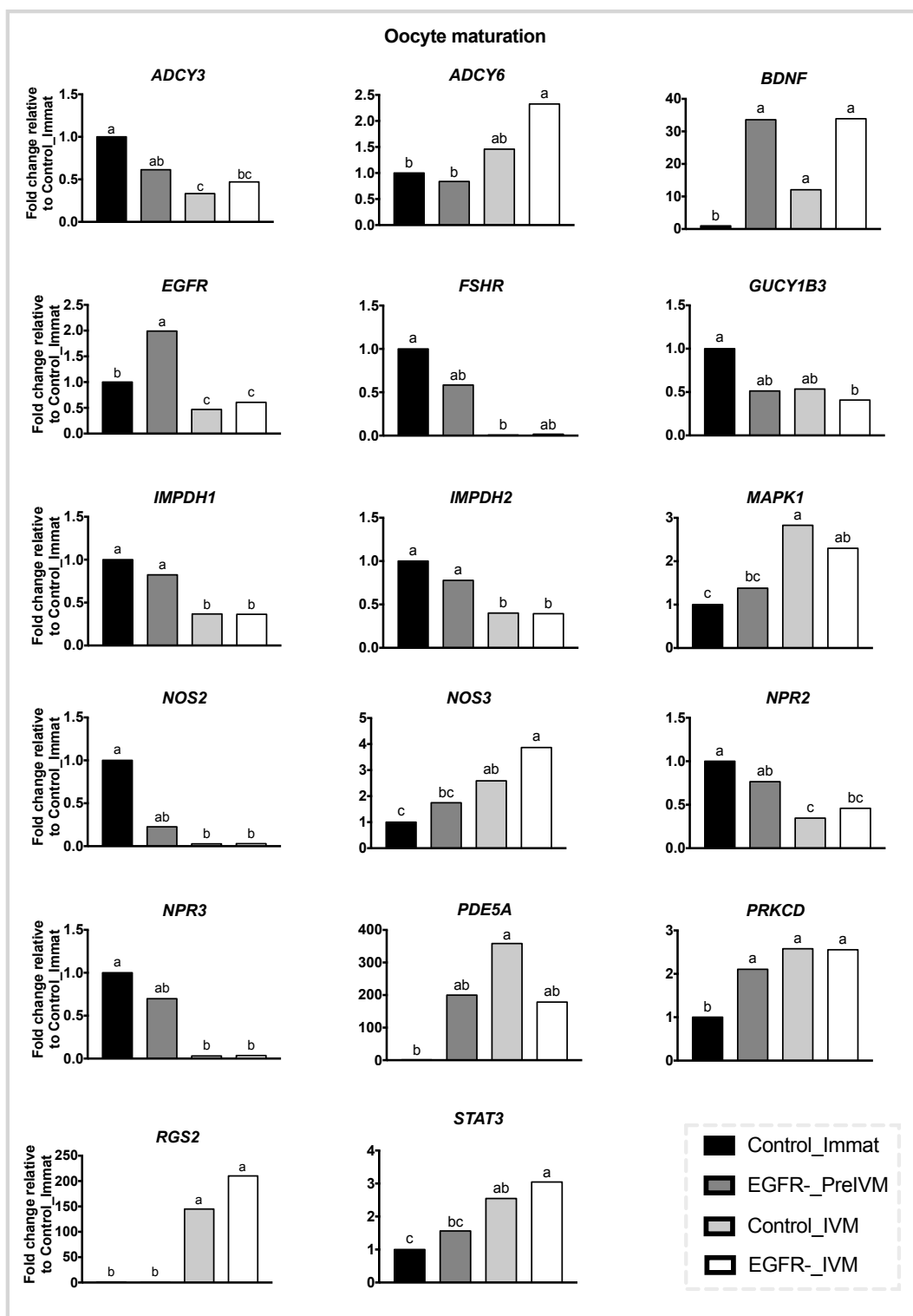


Figura 7. Genes relacionados à maturação oocitária, diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas derivadas de oócitos imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat), após 8h de pré-maturação com AG1478 (EGFR-PreIVM), após 22h de MIV (Control_IVM) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (EGFR-IVM). Os dados estão apresentados como *fold-change* relativo ao grupo Control_Immat. Letras distintas acima das barras indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

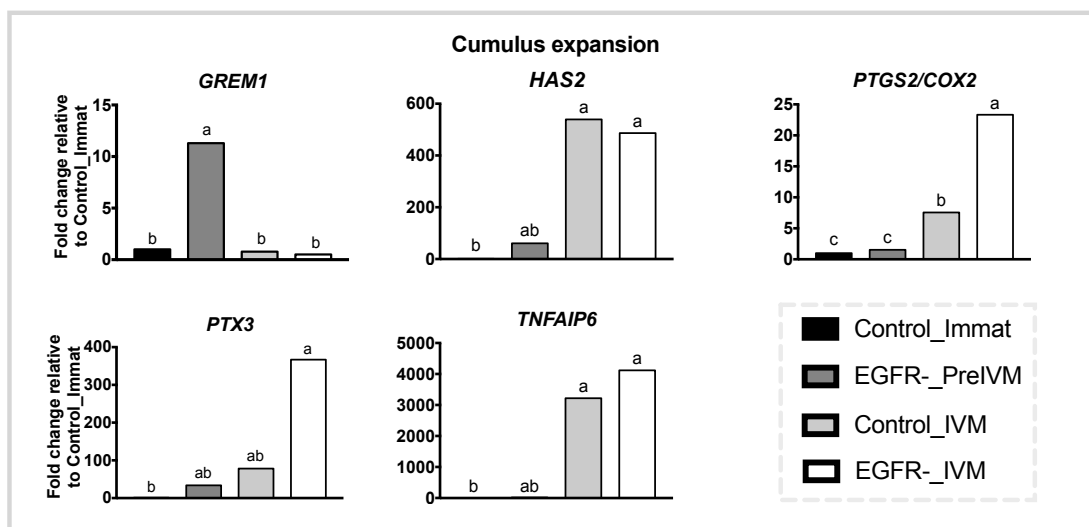


Figura 8. Genes relacionados à expansão das células do cumulus, diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas derivadas de oócitos imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat), após 8h de pré-maturação com AG1478 (EGFR_PreIVM), após 22h de MIV (Control_IVM) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (EGFR_IVM). Os dados estão apresentados como *fold-change* relativo ao grupo Control_Immat. Letras distintas acima das barras indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

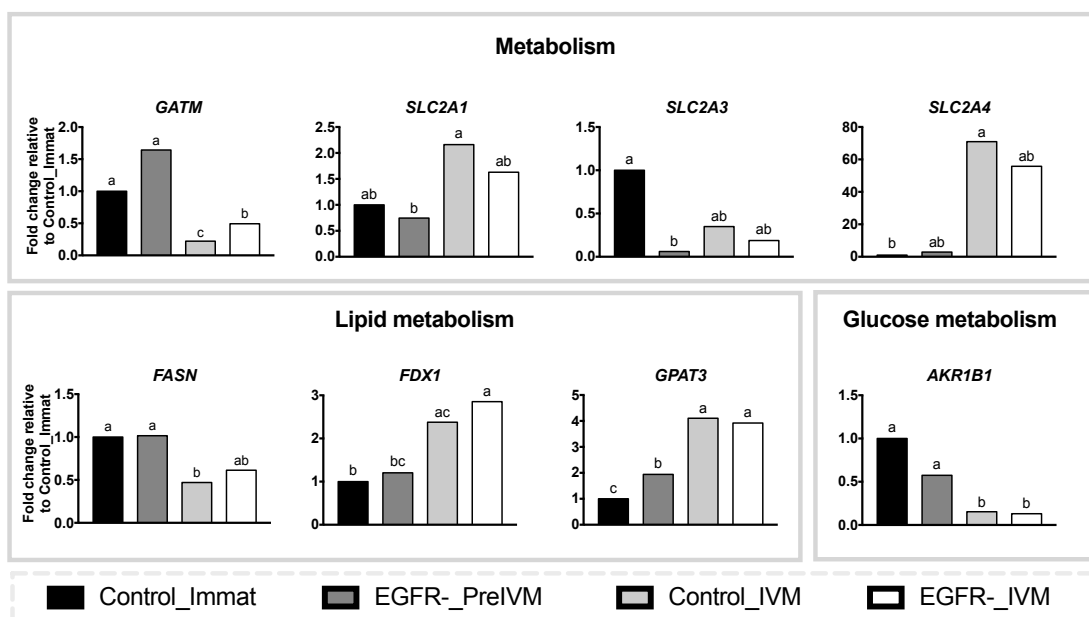


Figura 9. Genes relacionados ao metabolismo, metabolismo lipídico e metabolismo de glicose, diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas derivadas de oócitos imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat), após 8h de pré-maturação com AG1478 (EGFR_PreIVM), após 22h de MIV (Control_IVM) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (EGFR_IVM). Os dados estão apresentados como *fold-change* relativo ao grupo Control_Immat. Letras distintas acima das barras indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

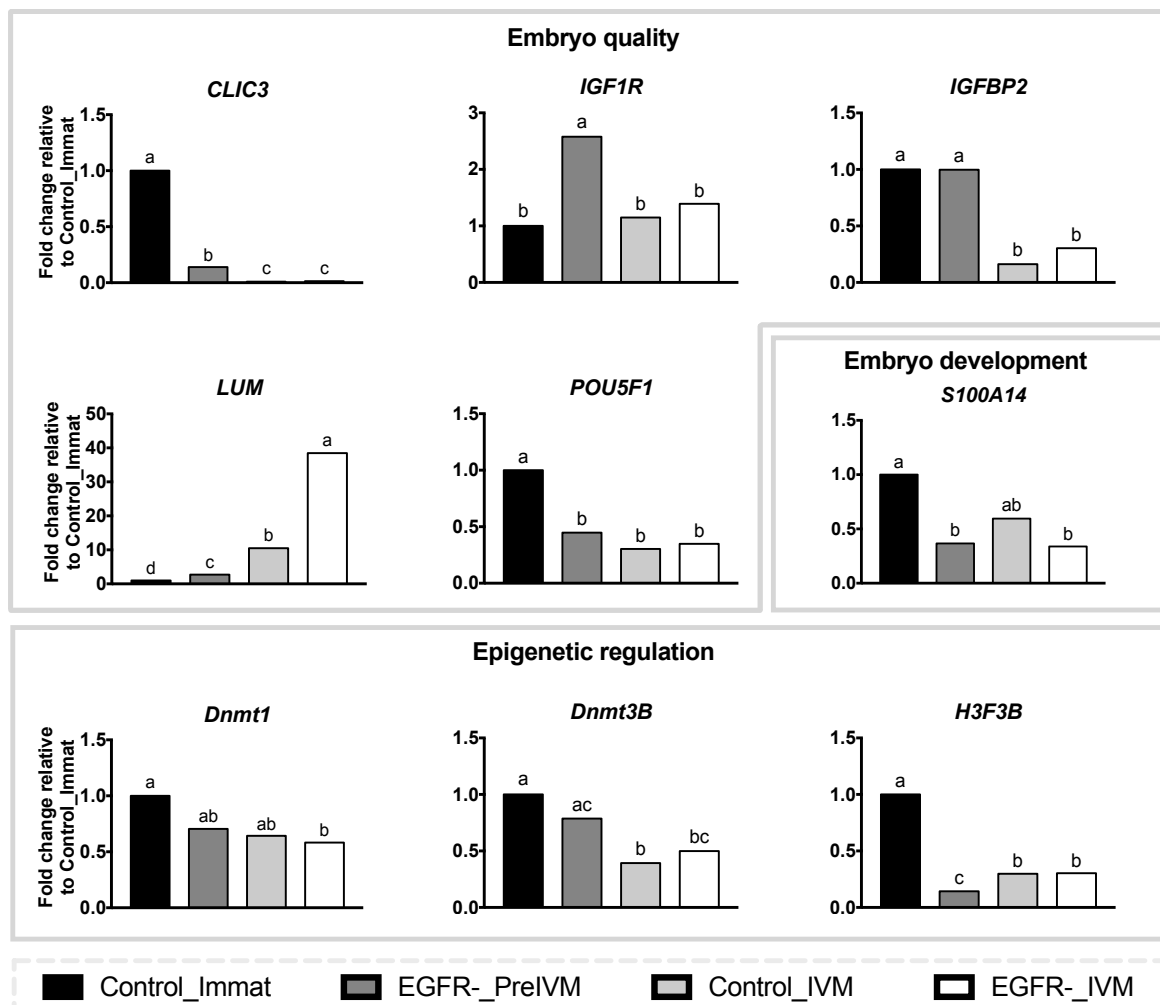


Figura 10. Genes relacionados à qualidade embrionária, desenvolvimento embrionário e regulação epigenética, diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas derivadas de oócitos imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat), após 8h de pré-maturação com AG1478 (EGFR-PreIVM), após 22h de MIV (Control_IVM) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (EGFR-IVM). Os dados estão apresentados como *fold-change* relativo ao grupo Control_Immat. Letras distintas acima das barras indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

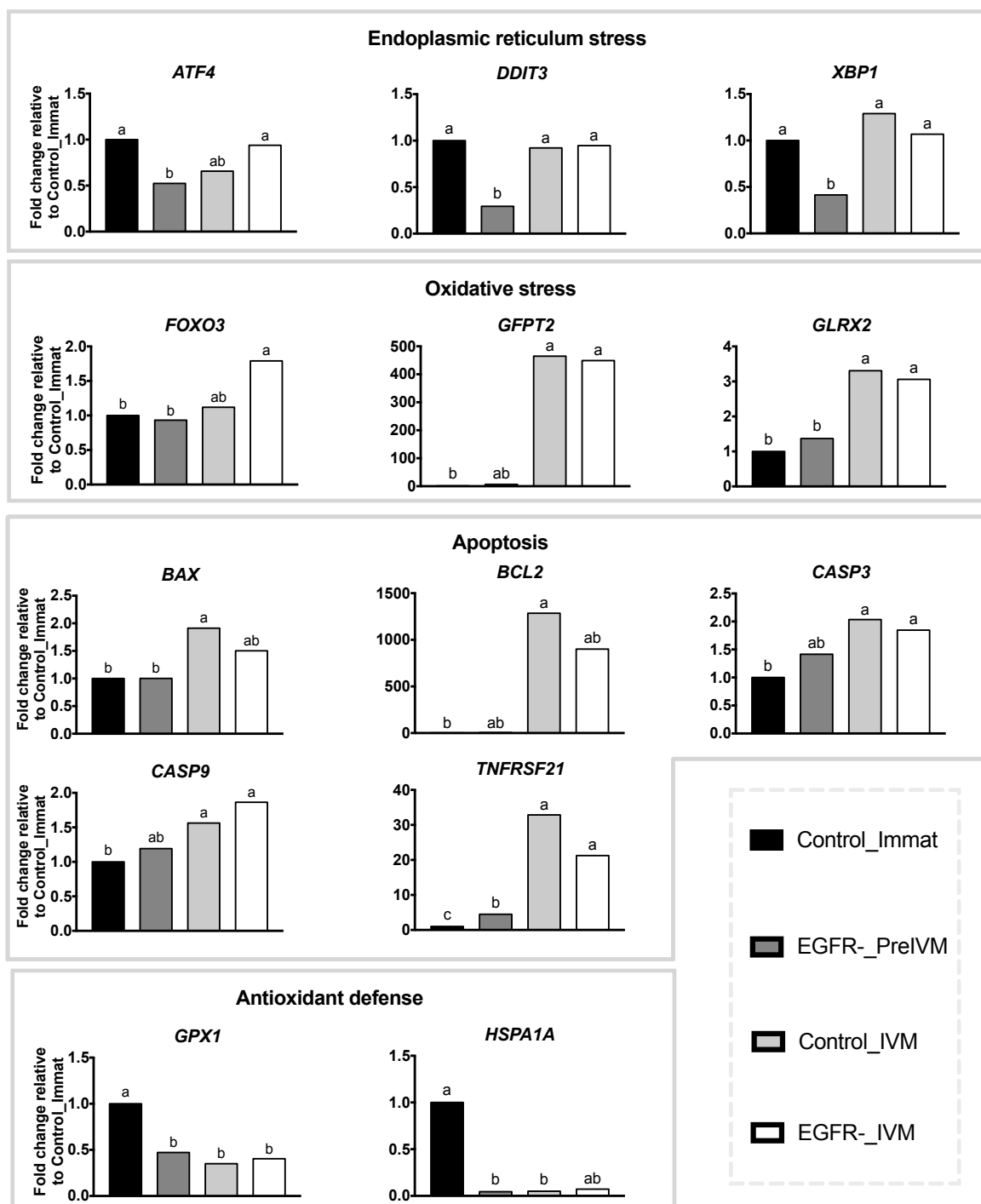


Figura 11. Genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo, apoptose e defesa antioxidante, diferencialmente expressos em células do cumulus bovinas derivadas de oócitos imediatamente após a remoção do folículo (Control_Immat), após 8h de pré-maturação com AG1478 (EGFR-PreIVM), após 22h de MIV (Control_IVM) e após 8h de pré-maturação com AG1478 seguida de 22h de MIV (EGFR-IVM). Os dados estão apresentados como *fold-change* relativo ao grupo Control_Immat. Letras distintas acima das barras indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4 Discussão

A pré-maturação é uma estratégia de cultivo que foi estabelecida visando a manutenção dos oócitos por um maior período de tempo com a meiose bloqueada no estágio de GV, ao mesmo tempo em que mantem a integridade da comunicação entre oócito e células somáticas via junções *gap*. A intenção dessa estratégia é que, devido ao maior período de tempo em cultivo, o oócito seja capaz de adquirir maior competência para o desenvolvimento (Gilchrist, 2011). Com base nessa proposta, o presente estudo foi desenvolvido para testar a eficácia do bloqueio do EGFR sobre a meiose e competência do oócito bovino pré-maturado com um inibidor do EGFR, o qual ainda não foi estudado com este objetivo em bovinos.

Os resultados demonstraram que, embora o bloqueio do EGFR nas células do cumulus não tenha sido capaz de manter o bloqueio meiótico oocitário na mesma proporção daqueles oócitos imaturos recém removidos do folículo ovariano (86.8% de GV em oócitos do grupo Control_Immat vs. 53.1% em oócitos do grupo EGFR_PreIVM), proporcionou maior taxa de manutenção em GV do que nos oócitos não submetidos à pré-maturação (32.4% Control_PreIVM). Assim, o tratamento proposto foi parcialmente efetivo na manutenção do bloqueio da meiose, contudo, foi demonstrado que oócitos em GV exibem diferentes padrões de configuração da cromatina [classificadas de GV0 (padrão filamentososo difuso) a GV3 (nível máximo de condensação)], que estão associados à diferentes graus de atividade transcricional, competência meiótica e de desenvolvimento do oócito (Lodde *et al.*, 2007). No presente estudo, a avaliação dos padrões de configuração da cromatina evidenciaram que o grupo EGFR_PreIVM apresentou a maior parte dos oócitos em GV1, diferentemente dos oócitos do grupo Control_PreIVM que estavam majoritariamente em GV3. Isso pode ser potencialmente benéfico, considerando que oócitos em GV1 ainda apresentam certa capacidade de transcrição (Lodde *et al.*, 2007), contrariamente aos oócitos que já tenham progredido até GV3, devido à condensação rápida e prematura da cromatina, associada à interrupção da atividade transcricional e diminuição da competência oocitária (Blondin *et al.*, 1997; Bilodeau-Goeseels, 2011; Luciano *et al.*, 2011; Lodde *et al.*, 2013). De acordo com nosso conhecimento, não existem outros estudos na literatura que tenham correlacionado o tratamento de oócitos bovinos com inibidores do EGFR durante a pré-maturação

com os padrões de condensação da cromatina no estágio de GV, de forma que este é o primeiro relato que demonstra um potencial efeito benéfico da pré-maturação sobre a atenuação da condensação rápida e progressiva que ocorre prematuramente em oócitos submetidos aos procedimentos de maturação *in vitro*.

Além disso, o posterior cultivo de MIV permitiu que esses oócitos retomassem e completassem a meiose de forma satisfatória, apresentando taxas de MII semelhantes aos grupos Control_IVM cultivados por 22 ou 30 horas. Todavia, oócitos maturados *in vitro* por períodos de tempo prolongados (acima de 26 horas) estão sujeitos ao envelhecimento, que leva ao aumento da taxa de degeneração (Heinzmann *et al.*, 2015) e à diminuição da competência oocitária para o desenvolvimento embrionário (Koyama *et al.*, 2014). Na estratégia de cultivo oocitário delineada para o presente estudo, os oócitos foram mantidos em cultivo por um total de 30 horas, sendo 8 horas em cultivo de pré-maturação seguido por mais 22 horas de MIV, de forma que o período estendido de cultivo poderia levar ao envelhecimento dos oócitos. Todavia, os resultados demonstraram menores taxas de degeneração nos oócitos pré-maturados do que naqueles cultivados por período prolongado sem prévio cultivo de pré-maturação (2,3% EGFR_IVM vs. 9,1% Control_IVM_30h), sugerindo que os oócitos não envelhecem pelo cultivo prolongado. Estes resultados corroboram com Nunes (2018) que avaliou a pré-maturação por 8h com inibidor do peptídeo natriurético do tipo C e sugeriu outro efeito benéfico da pré-maturação além do anteriormente discutido, que é a manutenção da viabilidade do oócito por período de tempo maior do que o padronizado para os procedimentos de PIV, visando, por exemplo, o transporte de oócitos obtidos por aspiração folicular de doadoras mantidas em fazendas distantes do laboratório e também quando há interesse do laboratório em sincronizar o momento de fecundação *in vitro* de oócitos colhidos em momentos diferentes, visando a otimização na utilização de palhetas de sêmen de elevado valor comercial.

Dentre os genes envolvidos na maturação oocitária, foi observada maior expressão de *EGFR* após a pré-maturação no grupo EGFR_PreIVM que poderia estar envolvido com maturação (Park *et al.*, 2004; Reizel *et al.*, 2010), porém como houve um bloqueio parcial, podemos sugerir que o aumento da expressão do gene não está relacionado com a formação do receptor ou que a transcrição deste gene pode ter sido estimulada pelo bloqueio dos receptores existentes. Também foi observada maior expressão de *BDNF*, que está relacionado com oócitos mais

competentes, por melhorar a maturação nuclear e citoplasmática (Kawamura et al., 2005).

A expansão das células do cumulus é um evento da maturação oocitária, caracterizado pela presença de um revestimento compacto e sem expansão em oócitos imaturos e o cumulus expandido nos oócitos maduros (Silva et al., 2011). Assim como foi encontrado neste estudo, demonstrando que a pré-maturação foi eficaz em retardar a expansão das células do grupo EGFR-PreIVM ao mesmo tempo em que retardou a maturação nuclear e, ao final do cultivo de MIV, os oócitos de ambos os grupos apresentaram o grau máximo de expansão, compatível com o final da maturação.

Essa expansão é mediada pelos fatores EGF-like mediante o estímulo do LH e ativação do EGFR que induzem a expressão de genes nas células do cumulus, os quais são responsáveis pela formação da matriz extracelular, como *HAS2*, *PTX3*, *TNFAIP6* e *PTGS1*, levando à expansão das células do cumulus (Shimada et al., 2006). Dentre os genes de expansão avaliados, a expressão foi semelhante entre os grupos Control_Immat e EGFR-PreIVM, indicando que o bloqueio do EGFR impediu a expressão destes genes, assim como já foi relatado na literatura em outras espécies (Ashkenazi et al., 2005; Park et al., 2004; Reizel et al., 2010). Como consequência, não foi observado aumento da expansão das células, que está diretamente relacionado com o fechamento das junções *gap* (Norris et al., 2010; Sugimura et al., 2015). Desta forma, a possível manutenção da integridade das junções *gap* durante a pré-maturação pode ser benéfica para a aquisição de competência oocitária (Gilchrist et al., 2016).

As gotas de lipídios citoplasmáticas são formadas por uma camada central de lipídios neutros, composta predominantemente por triglicérides e colesterol e uma camada externa de fosfolipídios e proteínas (Welte, 2015). As gotas de lipídios são importantes para a manutenção da homeostase de energia e do metabolismo lipídico; são utilizadas pelas células como fonte de energia, para a formação de membranas e como moléculas sinalizadoras (Welte, 2015). Sabe-se que a MIV favorece o acúmulo lipídico (Aardema et al., 2011), porém nós observamos que o tratamento com EGFR- durante a pré-maturação proporcionou uma redução significativa do conteúdo lipídico, a qual pode ter sido modulada pelo suplemento proteico do meio de cultivo e não pelo tratamento, uma vez que o cultivo com FCS favorece a incorporação e o estoque de lipídios citoplasmáticos em comparação com

o cultivo em meio livre de soro (Kim *et al.*, 2001). Portanto, decidimos avaliar a pré-maturação comparando os meios suplementados com FCS ou BSA e observamos que mesmo no meio suplementado com BSA o tratamento com EGFR- apresentou menor conteúdo lipídico após 8h de pré-maturação, demonstrando um efeito do tratamento e não do suplemento proteico.

Porém, após a MIV, verificamos um aumento no conteúdo lipídico no grupo EGFR-IVM em comparação com o grupo Control-IVM que pode ser devido a ativação de um mecanismo compensatório, devido à diminuição do acúmulo lipídico durante a pré-maturação, relacionado com aumento da expressão de *GPAT3*, que está envolvido na síntese de glicerolipídios (Bertolesi *et al.*, 2012), contribuindo para a formação das gotas de lipídios (Welte, 2015). Essas gotas são o estoque de lipídios citoplasmáticos, os quais são metabolizados nas mitocôndrias pela via da β -oxidação para produzir ATP conforme a necessidade das células (Welte, 2015) e, como eles são necessários para a proliferação das células da granulosa, produção de matriz extracelular e maturação nuclear (Dunning *et al.*, 2014), eles podem ter sido consumidos durante a MIV.

Dos genes de metabolismo, a maior expressão de *GATM* foi observada após a MIV e já foi correlacionada com maior capacidade de desenvolvimento (Bunel *et al.*, 2015), sendo que a expressão aumenta nas células do cumulus dos oócitos durante o período de *coasting* (Bunel *et al.*, 2014). E, apesar da diminuição da expressão de *SLC2A3* após a pré-maturação e do envolvimento da glicose na qualidade oocitária (Sutton-McDowall *et al.*, 2010), os demais genes relacionados ao metabolismo de glicose não foram alterados pelo tratamento e após a MIV.

Com relação ao desenvolvimento embrionário, foi observado que o aumento da expressão do gene *LUM* está relacionado com oócitos que irão se desenvolver até a fase de 8 células, ao passo que a diminuição na expressão de *CLIC3* está correlacionada com o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Bunel *et al.*, 2015), assim como a maior abundância de *IGF1R* está relacionada com oócitos de melhor qualidade (Sales *et al.*, 2015). *POU5F1* também está relacionado com a competência oocitária e deficiências na expressão dele levam à mortalidade embrionária (Regassa *et al.*, 2011), porém não foi observada diferença na expressão deste gene após a MIV. Além disso, a menor expressão de *H3F3B* deve ser melhor investigada, uma vez que em oócitos o knockout é letal (Tang *et al.*, 2015).

Os genes de estresse do retículo endoplasmático apresentaram menor abundância relativa ao final da pré-maturação. Assim como os de defesa antioxidante, *GPX1*, que é responsável por neutralizar o peróxido de hidrogênio (Cagnone & Sirard, 2016) e, *HSPA1A*.

Em conclusão, o tratamento com o inibidor do EGFR durante a pré-maturação proporcionou a manutenção de maiores taxas de oócitos em GV1 e menores em GV3, sugerindo aquisição de maior competência destes oócitos por atenuar a condensação rápida e progressiva da cromatina, o que, possivelmente, possa ter retardado o silenciamento da atividade transcricional. Além disso, foi observado menor grau de expansão das células do cumulus, associado a manutenção da expressão dos genes relacionados à expansão das células do cumulus em oócitos tratados semelhante aos oócitos imaturos, assim como a funcionalidade das junções *gap* que foi mantida durante o período de pré-maturação. Ao mesmo tempo, o posterior cultivo de MIV permitiu a retomada da meiose e o término da maturação nuclear de forma satisfatória sem os prejuízos observados no cultivo por tempo prolongado sem o tratamento de pré-maturação.

5 Referências

Aardema H, Vos PLAM, Lolicato F, Roelen BAJ, Knijn HM, Vaandrager AB, Helms JB, Gadella BM (2011) Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction** 85:62–69. doi: 10.1095/biolreprod.110.088815.

Albarracín JL, Morató R, Izquierdo D, Mogas T (2005) Vitrification of calf oocytes: Effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocytes and their subsequent development. **Molecular Reproduction and Development** 72:239-249. doi: 10.1002/mrd.20326.

Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB (2010) Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction** 25:2999-3011. doi: 10.1093/humrep/deq246.

Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiri A (2005) Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology** 146:77-84. doi:0.1210/en.2004-0588.

Bertolesi GE, Iannattone S, Johnston J, Zaremborg V, Mcfarlane (2012) Identification and expression analysis of *GPAT* family genes during early development of *Xenopus laevis*. **Gene Expression Patterns** 12:219-227. doi:10.1016/j.gep.2012.04.002.

Bilodeau-Goeseels S (2011) Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the

maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development** 78:734-743. doi: 10.1002/mrd.21337.

Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA (1997) *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology** 47:1061-1075. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00063-0.

Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sirard MA (2015) Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology** 83:228-237. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.019.

Bunel A, Nivet AL, Blondin P, Vigneault C, Richard FJ, Sirard MA (2014) Cumulus cell gene expression associated with pre-ovulatory acquisition of developmental competence in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development** 26:855-865. doi: 10.1071/RD13061.

Cagnone G, Sirard MA (2016) The embryonic stress response to *in vitro* culture: insight from genomic analysis. **Reproduction** 152:R247-R261. doi: 10.1530/REP-16-0391.

Da Rosa PRA, De Cesaro MP, Dau AMP, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves PBD (2017) Reversible meiotic arrest of bovine oocytes by EGFR inhibition and follicular hemisections. **Theriogenology** 99:53-62. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.014.

Dall'Acqua PC, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Gottardi FP, Mingoti GZ (2017) Delaying meiotic resumption during transportation of bovine cumulus-oocyte

complexes: effects on development, apoptosis and caspases activity of in vitro-produced embryos. **Zygote** 25:740-450. doi: 10.1017/S0967199417000636.

Dekel N (2005) Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology** 234:19-25. doi: 10.1016/j.mce.2004.09.010.

Dieci C, Lodde V, Franciosi F, Lagutina I, Tessaro I, Modina SC, Albertini DF, Lazzari G, Galli C, Luciano AM (2013) The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of Reproduction** 89:68. doi:10.1095/biolreprod.113.110577.

Dieci C, Lodde V, Labreque R, Dufort I, Tessaro I, Sirard MA, Luciano AM (2016) Differences in cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine embryo production. **Molecular Human Reproduction** 22:882–897. doi: 10.1093/molehr/gaw005.

Dunning KR, Russell DL, Robker RL (2014). Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction** 148 R15-R27. doi: 10.1530/REP-13-0251.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology** 71:836-848. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023.

Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modena SC, Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM (2014) Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction** 91:61 doi: 10.1095/biolreprod.114.118869.

Genicot G, Leroy JLMR, Van Soom A, Donnay I (2005) The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology** 63 1181-1194. doi:10.1016/j.Theriogenology.2004.06.006.

Gilchrist (2011) Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development** 23:23-31. doi: 10.1071/RD10225.

Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, De Vos M, Sugimura S, Smits J, Richard FJ, Thompson JG (2016) Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction** 152:R143-R157. doi: 10.1530/REP-15-0606.

Heinzmann J, Matter F, Aldag P, Bernal-Ulloa SM, Schneider T, Haaf T, Niemann H (2015). Extended in vitro maturation affects gene expression and DNA methylation in bovine oocytes. **Molecular Human Reproduction** 21 770-782. doi: 10.1093/molehr/gav040.

Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers NM, Dieleman SJ (2000) Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology** 53:11-20. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00236-8.

Jamnongjit M, Gill A, Hammes SR (2005) Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **PNAS** 102:16257-16262. doi: 10.1073/pnas.0508521102.

Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Gelpke MDS, Hsueh AJW (2005) Ovarian brain-derived neurotropic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. **PNAS** 102 9206-9211. doi: 10.1073 pnas.0502442102.

Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y (2001) Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122 131-138. doi: 10.1530/rep.0.1220131.

Koyama K, Kang SS, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M (2014) Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *Journal of Reproduction and Development* 60 136-142. doi: 10.1262/jrd.2013-115.

Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM (2007) Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development** 74:740–749. doi: 10.1002/mrd.20639.

Lodde V, Franciosi F, Tessaro I, Modina SC, Luciano AM (2013) Role of gap junction-mediated communication in regulating large-scale chromatin remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 30:1219-1226. doi: 10.1007/s10815-013-0061-7.

Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V (2011) Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction** 85:1252-1259. doi: 10.1095/biolreprod.111.092858.

Mehlmann LM (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction** 130:791-799. doi: 10.1530/rep.1.00793.

Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA (2008) Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development** 135:3229-3238. doi: 10.1242/dev.025494.

Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA (2010) EGF receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to luteinizing hormone. *Reproduction* 140 655-662. doi:10.1530/REP-10-0288.

Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA (2009) Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development** 136:1869-1878. doi: 10.1242/dev.035238.

Nunes GB (2018) Acúmulo de transcritos em células do cumulus cultivadas na presença do precursor do peptídeo natriurético tipo C e seus efeitos sobre a maturação e aquisição da competência do oócito na espécie bovina. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science** 303:682–684. doi: 10.1126/Science.1092463.

Prochazka R, Blaha M, Němcová L (2017) Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. **Biology of Reproduction** 97:537-549. doi: 10.1093/biolre/iox112.

Razza EM, Sudano MJ, Fontes PK, Franchi FF, Belaz KRA, Santos PH, Castilho ACS, Rocha DFO, Eberlin MN, Machado MF, Nogueira MF (2018) Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus-oocyte complexes and blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development** Apr 23. doi: 10.1071/RD17335.

Reizel Y, Elbaz J, Dekel N (2010) Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. **Molecular Endocrinology** 24:402-411. doi: 10.1210/me.2009-0267.

Regassa A, Rings F, Hoelker M, Cinar U, Tholen E, Looft C, Schellander K, Tesfaye D (2011) Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics** 12 57. doi: 10.1186/1471-2164-12-57.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, 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. doi: 10.1002/mrd.1153.

Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo LSA, Viana JHM, Souza JC, Baruselli PS (2015) Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science** 98:3086-3099. doi: 10.3168/jds.2014-8858.

Shimada M, Umehara T, Hoshino Y (2016) Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation process. **Reproductive Medicine and Biology** 15:201-216. doi: 10.1007/s12522-016-0236-x.

Silva IO, Vasconcelos RB, Caetano JVO, Gulart LVM, Camargo LSA, Báo SN, Silva AAMR (2011) Induction of reversible meiosis arrest of bovine oocytes using a two-step procedure under defined and nondefined conditions. **Theriogenology** 75: 1115-1124. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.021.

Sirard MA (2018) 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. **Reproduction** 156 R1-R7. doi: 10.1530/REP-18-0008.

Sugimura S, Ritter LJ, Rose RD, Thompson JG, Smitz J, Mottershead DG, Gilchrist RB (2015) Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. **Developmental Biology** 403:139-149. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.05.008.

Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG (2010) The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction** 139:685-695. doi: 10.1530/REP-09-0345.

Tang MCW, Jacobs SA, Mattiske DM, Soh YM, Graham AN, Tran A, Lim SL, Hudson DF, Kalitsis, O'Bryan MK, Wong LH, Mann JR (2015) Contribution of the two genes encoding histone variant H3.3 to viability and fertility in mice. **PLOS Genetics** 11:e1004964. doi: 10.1371/journal.pgen.1004964.

Vaccari S, Weeks II JL, Hsieh M, Menniti FS, Conti M (2009) Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of Reproduction** 81:595-604. doi: 10.1095/biolreprod.109.077768.

Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ (1990) Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. **Developmental Biology** 140:307-317.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology** 3 RESEARCH0034.

Welte MA (2015) Expanding roles for lipid droplets. **Current Biology** 25 R470-R481. doi: 10.1016/j.cub.2015.04.004.

CAPÍTULO 3 - Differences in embryonic gene expression and quality indicate the benefit of epidermal growth factor receptor inhibitor during prematuration to improve competence in bovine oocytes *

1. Title page

Title: Differences in embryonic gene expression and quality indicate the benefit of epidermal growth factor receptor inhibitor during prematuration to improve competence in bovine oocytes

Authors names and full addresses:

Priscila Chediek Dall'Acqua^{1,2}, Giovana Barros Nunes^{1,2}, Cíntia Rodrigues da Silva², Patrícia Kubo Fontes³, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira^{3,4}, Flávia Lombardi Lopes², Márcia Marinho², Gisele Zoccal Mingoti^{1,2}

¹ São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Department of Preventive Medicine and Animal Reproduction, Jaboticabal, São Paulo, Brazil

² São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine, Laboratory of Reproductive Physiology, Araçatuba, São Paulo, Brazil

³ São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Department of Pharmacology, Botucatu, São Paulo, Brazil

⁴ São Paulo State University (Unesp), School of Sciences, Humanities and Languages, Department of Biological Sciences, Assis, São Paulo, Brazil

Corresponding authors postal and email address:

GZ Mingoti. Universidade Estadual Paulista (UNESP), School of Veterinary Medicine, Department of Animal Health, Araçatuba 16050-680, São Paulo, Brazil. Tel: +55 18 3636 1375. Fax: +55 18 3636 1352. E-mail: gmingoti@fmva.unesp.br

Short title: Role of EGFR inhibition in oocyte competence

2. Abstract

The epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway is directly involved in oocyte meiotic resumption induced by a gonadotropic stimulus. Here, we used an EGFR inhibitor (AG1478) to inhibit spontaneous meiosis resumption in bovine oocytes (EGFR- group) during 8 hours prematuration and assessed the competence of such oocytes for embryonic development, lipid metabolism, apoptosis and gene expression in comparison to Control group which was not prematurated. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Blastocysts rate on day 7 (40.81%, averaged) and hatching rate on day 9 (77.35%, averaged) were unaffected by treatment ($P>0.05$). Similarly, treatment did not affect ($P>0.05$) the total cell number on day 7 (119.05, averaged) and on day 9 (189.5, averaged). Apoptosis was reduced ($P<0.05$) in EGFR- group day 7-embryos compared to Control group (3.7 ± 1.0 vs 5.2 ± 0.8). Abundance of several transcripts was upregulated ($P<0.05$) in EGFR- group, including genes related to embryo development and quality (*NANOG* and *RPLP0*), epigenetic regulation (*H2AFZ*), metabolism (*ACSL1*, *GPAT3*, *FADS2*, *FASN*, *FDX1* and *HMGCS1*), apoptosis (*BID*) and stress response (*GPX4* and *HIF1A*). Lipid content did not differ between treatments ($P>0.05$) in day 7- (1.0, averaged) and in day 9-embryos (0.35, averaged). Taken together, the results presented here demonstrated a reduction in the apoptosis index and upregulation of *NANOG*, *H2AFZ* and *RPLP0* mRNA levels, which are related to embryonic development. Our data suggest that temporary meiosis blockage with EGFR inhibitor during prematuration culture of bovine oocytes may be an interesting strategy to improve embryo quality.

3. Introduction

In vitro embryo production (IVP) in cattle has been carried out commercially on a large scale, but the technology has not yet reached the observed rates of *in vivo* embryo production since only about 32% of the *in vitro* fertilized oocytes develop to the blastocyst stage (Perry, 2016). It is largely accepted that the lower efficiency of IVP is mainly due to the use of a heterogeneous population of oocytes collected from antral follicles at different stages of their growth (Franciosi *et al.*, 2014). This is due to the fact that oocytes used in IVP are generally recovered from ovaries of unstimulated animals at random stages of the estrous cycle, regardless of whether the purpose is for research, where oocytes are from ovaries obtained from slaughterhouses, or for commercial purposes, where oocytes are obtained through follicular aspiration of live donors. In cattle, the oocytes recovered from follicles with a diameter greater than 2-3 mm have reportedly acquired the ability to resume meiosis and complete nuclear maturation, which means that they have acquired the meiotic competence (Lodde *et al.*, 2007). However, the ability to sustain fertilization and the early stages of embryo development, termed developmental competence, is gradually acquired by the oocyte as the follicle grows from 3 mm to 10 mm (Lodde *et al.*, 2007; Blondin *et al.*, 2012). Therefore, not all oocytes belonging to a heterogeneous population placed in culture for purposes of assisted reproduction have the essential components that allow their complete maturation and subsequent fertilization and full-term embryo development.

During follicular development, the oocytes maintained in prophase I (germinal vesicle (GV) stage) communicates with somatic cells through the gap junctional and paracrine mechanisms and accumulates the products necessary for fertilization and initial embryonic development (Albertini *et al.*, 2003; Sirard, 2011; Lodde *et al.*, 2007; Sanchez & Smits, 2012; Gilchrist *et al.*, 2016). Previous studies have indicated that the acquisition of oocyte competence involves the remodeling of the chromatin in the GV stage (Albertini *et al.*, 2003; Lodde *et al.*, 2007). In bovine oocytes, four chromatin configurations corresponding to different stages of developmental competence were described, namely GV0 to GV3 (Lodde *et al.*, 2007). Uncondensed chromatin (GV0 configuration) is found in growing oocytes from early antral follicles (up to 2 mm), while the other three patterns of chromatin configuration (from GV1 to GV3) have been characterized in fully-grown oocytes isolated from 2–6 mm middle antral follicles (Lodde *et al.*, 2007). During the progression in chromatin compaction, the

oocyte exhibits morphological changes in the nuclear and cytoplasmic compartments and a progressive decrease in transcriptional activity (Lodde *et al.*, 2007). Thus, oocytes in GV0 have limited meiotic competence and those in GV2 and GV3 stages have greater developmental capacity compared to oocytes in GV1 stage (Lodde *et al.*, 2007; Dieci *et al.*, 2016).

Removal of the bovine oocyte from the follicular environment for the purpose of IVP promotes precocious meiotic resumption (Gilchrist & Thompson, 2007) and the short duration of *in vitro* maturation (IVM) culture, compared to *in vivo* maturation may be insufficient for some oocytes, within the heterogeneous population placed in culture, to complete the nuclear and cytoplasmic maturation in a synchronized way. Consequently, not all *in vitro* matured oocytes can accumulate the necessary transcripts to promote embryonic development until the embryonic genome activation. In order to avoid this drastic change in the physiological sequence of the events that may compromise the acquisition of oocyte competence (Blondin *et al.*, 1997; Bilodeau-Goeseels, 2011), a temporary inhibition of spontaneous meiotic resumption has been proposed (Albuz *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016). The reason behind this approach, called prematuration, is to extend the IVM culture period maintaining the integrity of the functional gap-junction communications.

There are several options of drugs that can be used to stimulate a gradual chromatin transition while maintaining gap junctions open during prematuration culture. The most effective drugs reported in the literature are those that prevent a decrease in the level of intra-oocyte cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels by stimulating cAMP synthesis, such as forskolin, or by inhibiting the phosphodiesterase, an enzyme that degrades cAMP, such as cilostamide, milrinone or 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (Melhmann, 2005; Albuz *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2014; Dieci *et al.*, 2016; Dall'Acqua *et al.*, 2017; Razza *et al.*, 2018). More recently, the natriuretic peptide precursor C (NPPC) has also been investigated, as this drug indirectly prevents the decrease of cAMP levels by stimulating cyclic guanosine monophosphate (cGMP) synthesis (Franciosi *et al.*, 2014). Although most of these studies have reported an increase in the production and especially in the quality of the embryo, results are still modest, which encourages searches for new drugs.

More recently, the use of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors has been suggested, which seems to be an interesting and novel alternative in cattle (Da Rosa *et al.*, 2017). The actions of luteinizing hormone (LH) in the ovary are mediated by the EGFR pathway, which modulates

the traffic of second messengers, as cAMP and cGMP, between granulosa cells and oocyte through gap-junction communications (Jamnongjit *et al.*, 2005). The coupling of LH to its specific receptors (LHCGR) located in the plasma membrane of follicular cells (Prochazka *et al.*, 2017) promotes secretion of EGF-like factors epiregulin, amphiregulin and betacelulin by granulosa cells (Park *et al.*, 2004). The binding of these factors to EGFR in granulosa and cumulus cells activates the EGFR tyrosine-kinase, and the auto-phosphorylation of specific tyrosine residues contents result in the phosphorylation of target proteins and in the activation of other pathways (Park *et al.*, 2004), including mitogen-activated protein kinase (MAPK) and natriuretic peptides (NPs) pathways (Pangione *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014). As a consequence, this cascade of cellular events results in the resumption of meiosis with germinal vesicle breakdown (GVBD), cumulus cell expansion and closure of intercellular gap junctions (Reizel *et al.*, 2010; Nagyova, 2012; Prochazka *et al.*, 2012).

In the present study, we hypothesized that inhibition of EGFR during a prematuration culture could provide additional time for the acquisition of developmental competence of the bovine oocyte, improving the yield and quality of produced embryos. Therefore, the objective of the present study was to investigate the development, apoptotic status, lipid content and gene expression of embryos derived from oocytes treated with an inhibitor of EGFR during prematuration.

4. Materials and Methods

All chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise stated. The study was approved by the Bioethical Committee of the São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, SP, Brazil, under protocol number 12354/15.

COC collection and selection

Bovine ovaries were obtained from a local abattoir and transported to the laboratory in sterile saline solution at 30-35°C. Cumulus-oocyte complexes (COC) were retrieved from antral follicles (2-8 mm) with an 18-G needle and syringe. Collected COC were washed and selected in centrifuged follicular fluid supplemented with 75 µg/mL penicillin-streptomycin to prevent the immediate

resumption of meiosis. Only COC surrounded by at least four layers of compact cumulus cells and homogenous granulated ooplasm were used in this study.

Prematuration and IVM

The COC treated with EGFR (EGFR- group) were cultured *in vitro* in 100 μ L droplets of pre-IVM medium (TCM199 supplemented with 0.2 mM pyruvate, 25 mM sodium bicarbonate, 50 μ g/mL amikacin, 0.3% BSA and 1 μ M of the EGFR inhibitor, AG1478) covered with mineral oil (25 COC per droplet) for 8 hours at 38.5°C, 5% CO₂ in air and maximum humidity. Thereafter, treated COC were washed several times in the same medium without the inhibitor aiming the complete removal of the inhibitor and placed in IVM medium [TCM199 supplemented with 0.2 mM pyruvate, 25 mM sodium bicarbonate, 50 μ g/mL amikacin, 0.5 μ g/mL follicle stimulating hormone (FSH; Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 UI/mL human chorionic gonadotropin (hCG; Vetecor; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brazil) and 10% fetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)] covered with mineral oil. Oocytes from the Control group were placed in the IVM culture medium after their removal from the follicles, without being submitted to the prematuration culture. COC from both experimental groups were matured for 22 hours at 38.5°C, 5% CO₂ in air and maximum humidity. A schematic representation of the experimental groups and the evaluations carried out in this study is shown in Figure 1.

In vitro embryo production

Following IVM, COC were *in vitro*-fertilized (IVF) and the embryos were cultured for up to 9 days. Motile spermatozoa were obtained by centrifuging frozen-thawed semen through a discontinuous Percoll density gradient (45% over 90%; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for 5 min at 2500 *g* at room temperature. Spermatozoa (2×10^6 cells/mL) were added to the fertilization droplet containing 100 μ L fertilization medium (TALP-IVF, which consisted of 0.2 mM pyruvate, 25 mM sodium bicarbonate, 13 mM sodium lactate, 50 μ g/mL amikacin, 6 mg/mL BSA fatty acid free, 10 μ g/mL heparin, 20 μ M penicillamine, 10 μ M hypotaurine and 2 μ M epinephrine) covered with mineral oil. The COC (25 per droplet) and spermatozoa were co-incubated for 8 hours at 38.5°C and 5% CO₂ in humidified air. The day of IVF was defined as Day 0 (D0).

After fertilization, the presumptive zygotes were stripped from excessive cumulus cells by vortexing and transferred to 100 μ L droplets of modified synthetic oviduct fluid (mSOF) supplemented with 0.2 mM L-glutamine, 0.34 mM sodium citrate, 2.8 mM myo-inositol, 2% BME essential aminoacids, 1% MEM non-essential aminoacids, 0.2 mM pyruvate, 50 μ g/mL amikacin, 5 mg/mL BSA fraction V and 2.5% FCS. The embryo culture was performed at 38.5°C and 5% CO₂ in humidified air up to 9 days. Cleavage rate was assessed at 72 h post-insemination (h.p.i.), blastocyst rate was assessed at 168 h.p.i. (D7) and hatching rate was assessed at 216 h.p.i. (D9).

Assessment of apoptosis

The terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was performed to assess apoptotic rates in D7 embryos (blastocysts and expanded blastocysts), by using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Fluorescein; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), as previously described (Rocha-Frigoni *et al.*, 2014). Following the TUNEL reaction, embryos were washed twice in PBS-PVP and transferred to glass slides with mounting medium for fluorescence with DAPI (Vectashield with DAPI, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA). Slides were observed under an epifluorescence inverted microscope (IX51; Olympus, 20X magnification) at excitation and emission wavelengths of 510 and 590 nm, respectively. Nuclei with green–yellow fluorescence were considered TUNEL positive (fragmented DNA), whereas blue fluorescence (DAPI) indicated the total number of cells.

Quantification of intracellular lipid content

In order to evaluate the intracytoplasmic lipid content, expanded D7 blastocysts and hatched D9 embryos were stained with Nile Red, a lipid specific fluorescent dye that fluoresces yellow (580–596, 590 nm peak fluorescence) when detects neutral lipids, like triglycerides (lipid droplets), while fluorescing in the orange spectrum (597–620, 600 nm peak fluorescence) to detect polar lipids, like phospholipid bilayers (Genicot *et al.*, 2005). The procedures were adapted from a previously described protocol (Genicot *et al.*, 2005). Briefly, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 1 hour at room temperature, washed and transferred to 1 μ g/mL Nile Red for 30 min. Embryos were then washed and mounted in glass slides with mounting medium for fluorescence with DAPI.

Images were acquired under an epifluorescence inverted microscope (IX51; Olympus) at 20X magnification. The excitation and emission wavelengths were respectively 515-575 nm and 560-680 nm for Nile Red observations (thus, detecting neutral lipids), and 330-385 nm and 520 nm for DAPI observations. The ImageJ software (1.49v) was used to quantify the area and intensity of pixels from embryos. Background signal intensity was subtracted from the measured values of the treatment micrographs. For each embryo, staining intensity for Nile Red (expressed as arbitrary fluorescence units – AFU) was normalized to the DNA (DAPI), enabling means and standard errors of the means (SEM) to be calculated. In addition, the total cell number from embryos stained with DAPI was counted in these slides.

RNA extraction and messenger RNA reverse transcription

Total RNA was extracted from a pool of 10 D7-expanded blastocysts with the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions, including DNase treatment. Elution was performed in 20 µL-DEPC water. Total RNA concentration was evaluated by NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and the RNA integrity was assessed using a 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with the RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies). Reverse transcription (RT) was performed using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit with RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, for each 10 µL of RNA were added 2 µL of 10X Reverse Transcription Buffer, 0.8 µL of 25X dNTPs, 2 µL of 10X random primers, 1 µL of MultScribe Reverse Transcriptase, 1 µL of RNase inhibitor and 3.2 µL of nuclease-free water. The reaction was performed in PRC200 DNA Engine Thermal Cycler (MJ Research, CA, EUA) for 10 min at 25°C, 120 min at 37°C, 5 min at 85°C and 4°C to end. The cDNA samples were stored at -20°C until gene expression analysis.

Gene expression analysis by RT-qPCR

Gene expression analysis was performed using the Biomark HD System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA). We analyzed the mRNA abundance of 96 genes specific for *Bos taurus*. The evaluated genes are presented in Table 1, according to functional categories.

Prior to RT-qPCR analysis, each cDNA sample was submitted to sequence-specific preamplification process with 1.25 μ L assay mix (Taqman® Assay was pooled to a final concentration of 0.2X for each of the 96 assays), 2.5 μ L TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, #4391128) and 1.25 μ L cDNA (5ng/ μ L). Reactions were activated at 95°C for 10 min followed by denaturation at 95°C for 15 s, annealing and amplification at 60°C for 4 min in 14 cycles. These preamplified products were diluted 6-fold prior to qPCR analysis.

For gene expression analysis, each sample solution prepared consisted of 2.25 μ L cDNA (preamplified products), 2.5 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) and 0.25 μ L of 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm), and the assay solution consisted of 2.5 μ L of 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) and 2.5 μ L of 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). The 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm) chip was used to data collection. After priming, the chip was loaded with 5 μ L of each assay solution and 5 μ L of each sample solution. The qPCR thermal cycling was performed in the Biomark HD System using the protocol TaqMan GE 96x96 Standard, that consisted of one stage of Thermal Mix (50°C for 2 min, 70°C for 20 min and 25°C for 10 min) followed by a Hot-Start stage (50°C for 2 min and 95°C for 10 min), followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 15 s), primer annealing and extension (60°C for 60 s).

Analysis was performed in four independent biological replicates and the cycle threshold (Ct) values were calculated by the Biomark Real Time PCR software (Fluidigm). Assay included beta actin (*ACTB*), beta-2-microglobulin (*B2M*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) and succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (*SDHA*) as putative endogenous control genes, whose transcript abundance stability were analyzed by ANOVA and the GeNorm algorithm (Vandesompele *et al.*, 2002). Thus, the endogenous controls chosen for this study were the most stable genes (*ACTB* and *HPRT1*) considering no significant differences after ANOVA test and a M-value less than 1.5. The Δ Ct values were calculated by the geometric mean of the reference genes and were used for the statistical analysis. The Δ Ct values of target samples were normalized to the control samples to generate $\Delta\Delta$ Ct. For graphical representation, the fold-changes were calculated by the $2^{-\Delta\Delta$ Ct in relation to control group.

The differentially expressed genes with a $P < 0.05$ and fold change > 1.5 and < -1.5 were uploaded to Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen) software for the clustering of genes into common biological, cellular and molecular functions. Functions were considered significant when $P < 0.05$ and were adjusted based on Benjamini-Hochberg correction for multiple testing. The function analysis generated statistically significant predictions, based on z-score, for increased or decreased activity in several cellular functions, allowing the identification of predicted regulators associated to the changes found at the transcript level.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times, in independent replicates. Within each replicate, embryonic *in vitro* development (rates of cleavage and development to the blastocyst stage) was calculated as the percentages of total COC subjected to IVM. The normality of the residues was tested by Shapiro-Wilk's test. Data stated as percentages were arcsine-transformed before the analysis. Relative gene expression levels were analyzed after the calculation of the expression ΔCt followed by a logarithmic transformation when needed.

Data analysis was performed by Student's t test or Mann Whitney's test. The variation of embryonic intracellular lipid content over time was analyzed by linear regression, with Y arbitrary fluorescence and X time.

All data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Differences between treatments with $P < 0.05$ were considered significant.

5. Results

Prematuration with EGFR inhibitor do not affect oocyte competence for the production of bovine embryos

Developmental rates of oocytes treated or not with an inhibitor of EGFR are presented in Table 2. Treatment had no effect on cleavage rates ($P = 0.28$), embryonic development to the blastocyst stage at D7 ($P = 0.39$) and hatching at D9 ($P = 0.66$). Similarly, the number of blastomeres in expanded D7- ($P = 0.62$) and hatched D9-blastocysts ($P = 0.18$) did not differ between treatments.

Apoptosis index is decreased in blastocysts produced from oocytes prematured with EGFR inhibitor

The percentage of apoptotic cells (proportion of TUNEL-positive blastomeres) in D7 blastocysts is presented in Figure 2. A decrease ($P=0.046$) in the apoptosis index was observed in embryos derived from oocytes treated with EGFR- during prematuration (3.7 ± 1.0) when compared to the Control group (5.2 ± 0.8).

Intracellular lipid content is not altered in blastocysts produced from oocytes prematured with EGFR inhibitor

Illustrative images of blastocysts stained with Nile Red are presented in Figure 3. Under the conditions used for analysis, mainly neutral lipids (lipid droplets) were detected in embryos. The intracellular lipid content on D7 (1.0 AFU, averaged; $P=0.15$) and D9 (0.35 AFU, averaged; $P=0.11$) embryos was similar between treatments (Figure 3). However, linear regression analysis showed a significant reduction ($P<0.05$) on lipid content over time for both the Control and EGFR- groups, with an R square value of 1 (Figure 3).

Prematuration with EGFR alters the relative transcript abundance in blastocysts

Among the 86 genes evaluated in the present study (Table 3), the transcript levels of 12 genes were upregulated ($P<0.05$) in D7 expanded blastocysts derived from oocytes prematured with the EGFR inhibitor (EGFR- group) compared to the Control group (Figure 4). Genes affected by the treatment are associated with metabolism [Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 1 (*ACSL1*; $P=0.04$), 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 3 (*GPAT3*; $P=0.005$), Fatty Acid Desaturase 2 (*FADS2*; $P=0.01$), Fatty acid synthase (*FASN*; $P=0.02$), Ferredoxin 1 (*FDX1*; $P=0.03$)] and 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 1 (*HMGCS1*; $P=0.02$), apoptosis [BH3 interacting-domain death agonist (*BID*; $P=0.03$)], stress response [Glutathione Peroxidase 4 (*GPX4*; $P=0.02$) and Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit (*HIF1A*; $P=0.02$)], epigenetic regulation [H2A Histone Family Member Z (*H2AFZ*; $P=0.04$)], embryo quality [Nanog Homeobox (*NANOG*; $P=0.03$)] and embryo development [Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (*RPLP0*; $P=0.02$)].

Functional analysis of differentially expressed genes

Ingenuity pathway analysis (IPA®, Qiagen) program identified 28 canonical pathways significantly overrepresented in EGFR- group compared to Control. Table 4 shows the canonical pathways and the differentially expressed genes in each one.

Downstream analysis of genes regulated by the transcription factors from mitogen-activated protein kinase kinase (Mek) group, peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA), tumor protein P53 (TP53) and EGFR revealed genes with significant fold changes. Those relationships are shown in Figure 5.

Downstream analysis of *NANOG* activation in EGFR- group revealed the relationships regulating biological functions that are involved in embryonic development (Figure 6).

Network analysis of the interaction of pathways involved in lipid metabolism shows the upregulation of the genes on EGFR- group in comparison to Control (Figure 7).

6. Discussion

Despite the many efforts to increase IVP yield to the level of *in vivo* production, advances are still very limited. In addition, the quality of embryos produced *in vitro* is lower when compared to those produced *in vivo*, mainly due to the lower competence of oocytes prematurely removed from the follicular environment. In the present study we demonstrate that the blockade of spontaneous resumption of meiosis by inhibiting the EGFR influences the quality of the resulting embryos.

The prematuration approach was conceived with the objective of increasing the developmental potential of oocytes (Hendriksen *et al.*, 2000). However, as several groups have demonstrated over the last decade, the resulting increase in embryo production rates is modest at best. Likewise, in the present study we found no improvement either in blastocyst and hatching rates, or in the total number of blastomeres of embryos derived from oocytes treated with EGFR inhibitor during prematuration. Nonetheless, embryos derived from treated oocytes exhibited higher transcript levels of genes related to development and quality, such as *NANOG*, *H2AFZ* and *RPLP0*. *NANOG* is a pluripotency marker localized in the inner cell mass, upregulated in the epiblast (Denicol *et al.*, 2014), and its activation promotes the development, expansion, self-renew and pluripotency of stem cells, and the generation of embryoblast and epiblast cells (Figure 6). *H2AFZ* encodes for a variant of

the histone octamer member H2A with an unknown function in early embryo development (Négron-Pérez *et al.*, 2017), but the overexpression in embryos was correlated with pregnancy to term. Also, the *RPLP0* gene, a structural constituent of ribosomes, is increased in embryos that develop until the end of pregnancy (Ghanem *et al.*, 2011). These results suggest that the embryos derived from oocytes prematured in the presence of EGFR inhibitor are likely to have improved development and quality. Probably, meiotic blockade with EGFR inhibition leads to improved oocyte competence because it is supposed to keep the communicating junctions open, allowing the oocyte to accumulate substances during prematuration, which could improve developmental capacity. However, the gap junction functionality between oocyte and somatic cells was not evaluated in the present study and additional studies are needed to assess the mRNA transcript levels in cumulus cells under EGFR inhibition .

The molecular prediction analysis of the embryo development related genes shows that the upregulation of *NANOG* observed in the present study is downstream of a downregulation of *TP53* (Figure 5), a transcription factor that regulates cellular growth, proliferation and survival by PI3-kinase/Akt pathway (Nayak & Cooper, 2012). The upstream regulator tumor suppressor *TP53* is activated in response to DNA damage and other forms of cellular stress (Nayak & Cooper, 2012) and acts as a negative regulator of cellular growth, inducing cell cycle arrest or apoptosis (Brown *et al.*, 2007) which happens downstream the activation of PI3-kinase/Akt signaling (Nayak & Cooper, 2012). Thus, downregulation of this transcription factor suggests a decrease in the activation of apoptosis pathways, which is in accordance with the decrease in the apoptosis index observed in D7-blastocysts derived from EGFR- group. However, despite this observed phenotypic difference, the levels of the pro-apoptotic genes *BAX*, *CASP3* and *CASP9*, and of the anti-apoptotic gene *BCL-2* were unaffected by the treatment, although an unexpected increase in the mRNA levels of the pro-apoptotic gene *BID* was observed. However, as other stress related genes were unaffected by treatment, the overall results suggest that inhibition of EGFR during prematuration of oocytes did not induce the activation of the apoptosis pathway in the resulting embryos. On the contrary, results suggest that the additional time in culture seems to have allowed better culture conditions for the oocyte to accumulate substances during IVM that were essential for the decrease in the rate of embryonic cell apoptosis.

Despite the increase in *BID* levels, the expression of genes related to stress response *GPX4* and *HIF1A* were increased in embryos derived from treated oocytes. Embryonic stress response is driven by an oxidative reaction triggered by glutathione peroxidase (GPX), in which reduced glutathione (GSH) acts as a hydrogen peroxide scavenger (Cagnone & Sirard, 2016). In this way, the upregulation of *GPX4* demonstrates an embryonic response to oxidative stress. Also, the stress response to hypoxia may upregulate *HIF1A*, a proangiogenic regulator that stimulates the hypoxia induced factor pathway (Rizov *et al.*, 2017). In the present study, higher levels of *HIF1A* could have been triggered by the downregulation of *TP53* (Figure 5), and the upregulation of *PPARA* and *Mek* molecules, the upstream regulators that lead to *HIF1A* activation. However, looking at the molecule activity prediction analysis provided by IPA (Figure 5), we could speculate that the upregulation of *HIF1A* is related to EGFR pathway activation and acts similarly to the neoangiogenesis that occurs in the follicle in response to LH surge, in which hypoxic signaling through *HIF1A* regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) and promotes luteal vascularization (Van Den Driesche *et al.*, 2008). Thus, since defects in angiogenesis are related to miscarriage (Rizov *et al.*, 2017), upregulation of *HIF1A* suggests an increase in embryo quality, since the stimulation of angiogenesis in the embryo at the early stage of development is essential for implantation.

During embryonic development, the demand of lipids necessary to form the cellular membranes is in part controlled by the GPAT family members that catalyze the first steps of glycerolipids synthesis (Bertolesi *et al.*, 2012). Specifically, *GPAT3* expression is increased during neurulation and organogenesis in *Xenopus laevis* embryos (Bertolesi *et al.*, 2012) and the *FDX1*, a gene that encodes enzymes involved in cholesterol metabolism, was found to be highly expressed in the trophectoderm of human embryos (Assou *et al.*, 2012). Cellular membranes are formed by phospholipids, cholesterol, other lipids and proteins and it is widely known that modifying these components in the embryonic cell membranes may increase their fluidity and benefit cryopreservation (Seidel Jr, 2006). Levels of these genes were increased in the embryos derived from treated oocytes in the present study, suggesting an improvement in embryo membrane quality, more specifically an increase in fluidity as a result of increased membrane cholesterol. However, the conditions used for lipid analysis in the present study did not allow evaluation of membrane composition. Therefore additional studies are needed to evaluate possible effects on embryo cryotolerance.

In addition to the lipid metabolic pathway, the cholesterol biosynthesis pathway was also enhanced in our study by the increased expression of *HMGCS1*, a gene involved in the synthesis of the cholesterol precursor HMG-CoA that was found to be down-regulated in bovine blastocysts cultured with BSA in the presence of serum lipids (Cagnone & Sirard, 2014). In addition, comparing to embryos *in vivo* produced, the embryonic expression of *HMGCS1* was always higher in IVP embryos, independent of serum content in the media (Heras *et al.*, 2016). Cholesterol has a membrane stabilizing property, modifying how membrane phospholipids interact with each other (Seidel Jr, 2006), which may suggest an improvement in the resistance of the EGFR- group to cryopreservation procedures. Also, an analysis of the membrane lipid profile and the balance of saturated and unsaturated fatty acids could be studied in the future, given its potential to alter membrane fluidity and resistance to cryopreservation (Al Darwich *et al.*, 2010).

In our study, the increased expression of genes related to lipogenesis could be in part a response to the inhibition of the upstream regulator *TP53*. Activation of *TP53* has been previously associated to lipogenesis inhibition in adipocytes through down-regulation of downstream enzymes of the sterol regulatory element-binding protein (*SREBP*), including *FASN* (Yahagi *et al.*, 2003). In bovine embryos, the *SREBP* pathway seems to be regulated by polyunsaturated fatty acids that lead to a decrease on *FADS2* expression and do not change *FASN* expression (Al Darwich *et al.*, 2010). However, based on our results we could speculate that the downregulation of *TP53* was responsible for the increase in the expression of *FASN* and *HMGCS1*, which in turn is related to lipid and cholesterol biosynthesis, as a possible reflection of the changes on oocyte and cumulus cells transcriptome and metabolism following EGFR- treatment.

The increased expression of *ACSL1* and *FASN* are related to storage and metabolism of fatty acids. The fatty acid synthesizer is an enzyme, codified by *FASN*, important for lipogenesis, and higher expression of this gene, modulated by cortisol supplementation during IVM, was correlated with higher blastocyst rates (Da Costa *et al.*, 2016). Similarly, in our study, *FASN* is predicted to be activated by EGFR, suggesting that the modulation of EGFR during prematuration could alter EGFR expression later on development, leading to an increase in lipogenesis related gene expression in blastocysts. On the other hand, *ACSL1* activates the long-chain fatty acid for β -oxidation (Van Hoeck *et al.*, 2013). Increasing β -oxidation by the supplementation of culture media with L-carnitine improves

embryo development (Sutton-McDowall *et al.*, 2012), suggesting that an increased lipolysis, by overexpression of *ACSL1* in EGFR- group, has a potential to make good quality embryos.

Lipolysis is directly related to the upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor A (*PPARA*), a key regulator of lipid metabolism that increases the expression of genes responsible for fatty acid mobilization and oxidation, consequently reducing the lipid deposition (Lee *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2017). Probably, in our study, the maintenance of lipid content is related to the upregulation of *FASN*, *FADS*, *HMGCS1* and *HIF1A* by the upstream regulator *PPARA*, as showed by molecule activity prediction, and the upregulation in genes that promotes lipolysis and lipogenesis is responsible for the balance.

A recent study (Razza *et al.*, 2018) that investigated the effects of prematuration on lipid metabolism found an increase in lipid droplets in the oocytes associated with genes that promotes lipid accumulation in cumulus cells, and a decrease in droplets in the embryos without changes in the gene expression, probably as a consequence to higher metabolic activity in the early stages of embryonic development, as a sort of compensatory behavior. However, contrary to this study, we found an upregulation of genes related to lipid metabolism in the blastocysts of EGFR- group that increases synthesis, concentration, accumulation and deposition of several types of lipids. However, these genes were not associated with higher lipid content in the embryos, once there were no differences in lipid accumulation even when embryos were cultured up to day 9. We only observed a decrease in the amount of lipids over time from expanded blastocysts to the hatched ones, as previously described (Barceló-Fimbres & Seidel, 2011). Thus, to better understand the mechanism involved in the lipid metabolism of embryos derived from oocytes previously submitted to prematuration, oocyte evaluation would be required to investigate whether embryonic metabolism is a compensatory reflex of changes in lipid metabolism during IVM. However, as the activation of metabolic pathways, including lipid metabolism, can be modulated by cyclic nucleotides (Dunning *et al.*, 2014), which in turn are modulated by the EGFR pathway (Park *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014), we strongly suggest that inhibition of EGFR during prematuration may have affected embryonic lipid metabolism.

Altogether, our data suggest that meiosis blockage by inhibiting EGFR during prematuration culture of bovine oocytes may be an interesting strategy to improve the ability of the oocytes to

generate higher quality embryos. Results presented here demonstrated a reduction in the apoptosis index and upregulation of *NANOG*, *H2AFZ* and *RPLP0* mRNA transcript levels, which are genes related to embryonic development.

7. Declaration of interest

There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

8. Funding

This work was supported by FAPESP (grant number 2015/06733-5 and 2012/50533-2); CNPq (grant number 307416/2015-1). PCDA and GBN were supported by a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazil.

9. Acknowledgements

The authors thank Brasfrigo for donating the biological material used in the present study. Adão A. Custodio and Alexandre J. Teixeira for technical support. Erivelto C.A. Junior and Leandro E. Garcia for their help with the IPA program.

10. References

- Al Darwich A, Perreu C, Petit MH, Papilier P, Dupont J, Guillaume D, Mermillod P & Guignot F** 2010 Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKa phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91 30-36. (doi:10.1016/j.prostaglandins.2010.06.002)
- Albertini DF, Sanfins A & Combelles CM** 2003 Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online* 6 410 – 415. (doi: 10.1016/S1472-6483(10)62159-1)

Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG & Gilchrist RB 2010 Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum Reprod* **25** 2999-3011. (doi: 10.1093/humrep/deq246)

Assou S, Boumela I, Haouzi D, Monzo C, Dechaud H, Kadoch IJ & Hamamah S 2012 Transcriptome analysis during human trophoctoderm specification suggests new roles of metabolic and epigenetic genes. *PloS One* **7** e39306. (doi:10.1371/journal.pone.0039306)

Barceló-Fimbres M & Seidel Jr GE 2011 Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. *Theriogenology* **75** 434-444. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.09.007)

Bertolesi GE, Iannattone S, Johnston J, Zaremborg V & McFarlane 2012 Identification and expression analysis of *GPAT* family genes during early development of *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns* **12** 219-227. (doi:10.1016/j.gep.2012.04.002)

Bilodeau-Goeseels S 2011 Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* **78** 734-743. (doi: 10.1002/mrd.21337)

Blondin P, Coenen K, Guilbault LA & Sirard MA 1997 In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* **47** 1061-1075. (doi: 10.1016/S0093-691X(97)00063-0)

Blondin P, Vigneault C, Nivet AL & Sirard MA 2012 Improving oocyte quality in cows and heifers – What have we learned so far? *Anim Reprod* **9** 281-289.

- 519 **Brown L, Boswell S, Raj L & Lee SW** 2007 Transcriptional targets of p53 that regulate cellular
520 proliferation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **17** 73-85. (doi: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v17.i1.50)
521
- 522 **Cagnone G & Sirard MA** 2014 The impact of exposure to serum lipids during in vitro culture on the
523 transcriptome of bovine blastocysts. *Theriogenology* **81** 712-722.
524
- 525 **Cagnone G & Sirard MA** 2016 The embryonic stress response to in vitro culture: insight from
526 genomic analysis. *Reproduction* **152** R247-R261. (doi: 10.1530/REP-16-0391)
527
- 528 **Da Costa NN, Brito KNL, Santana PPB, Cordeiro MS, Silva TVG, Santos AX, Ramos PC, Santos**
529 **SSD, King WA, Miranda MS & Ohashi OM** 2016 Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and
530 embryo development in vitro. *Theriogenology* **85** 323-329. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.08.010)
531
- 532 **Da Rosa PRA, De Cesaro MP, Dau AMP, Duggavathi R, Bordignon V & Gonçalves PBD** 2017
533 Reversible meiotic arrest of bovine oocytes by EGFR inhibition and follicular hemisections.
534 *Theriogenology* **99** 53-62. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.014)
535
- 536 **Dall'Acqua PC, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Gottardi FP & Mingoti GZ** 2017 Delaying meiotic
537 resumption during transportation of bovine cumulus-oocyte complexes: effects on development,
538 apoptosis and caspases activity of in vitro-produced embryos. *Zygote* **25** 740-450. (doi:
539 10.1017/S0967199417000636)
540
- 541 **Denicol AC, Block J, Kelley DE, Pohler KG, Dobbs KB, Mortensen CJ, Ortega MS & Hansen PJ**
542 2014 The WNT signaling antagonist Dickkopf-1 directs lineage commitment and promotes survival of
543 the preimplantation embryo. *FASEB J* **28** 3975-3986. (doi: 10.1096/fj.14-253112)
544
- 545 **Dieci C, Lodde V, Labreque R, Dufort I, Tessaro I, Sirard MA & Luciano AM** 2016 Differences in
546 cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine
547 embryo production. *Mol Hum Reprod* **22** 882-897. (doi: 10.1093/molehr/gaw005)

548

549 **Dunning KR, Russell DL & Robker RL** 2014 Lipids and oocyte developmental competence: the role
550 of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* **148** R15-R27. (doi: 10.1530/REP-13-0251)

551

552 **Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modena SC, Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM,**
553 **Albertini DF & Luciano AM** 2014 Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and
554 sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod* **91**
555 61 (doi: 10.1095/biolreprod.114.118869)

556

557 **Genicot G, Leroy JLMR, Van Soom A & Donnay I** 2005 The use of a fluorescent dye, Nile red, to
558 evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology* **63** 1181-1194. (doi:10.1016/j.
559 Theriogenology.2004.06.006)

560

561 **Ghanem N, Salilew-Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K**
562 **& Hoelker M** 2011 Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar
563 expression of developmentally important genes although derived from different culture environments.
564 *Reproduction* **142** 551-564. (doi: 10.1530/REP-10-0476)

565

566 **Gilchrist RB & Thompson JG** 2007 Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to
567 improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* **67** 6 – 15. (doi:
568 10.1016/j.theriogenology.2006.09.027)

569

570 **Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, De Vos M, Sugimura S, Smits J,**
571 **Richard FJ & Thompson JG** 2016 Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides.
572 *Reproduction* **152** R143-R157. (doi: 10.1530/REP-15-0606)

573

574 **Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers NM & Dieleman SJ** 2000 Bovine follicular
575 development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* **53** 11-20. (doi:
576 10.1016/S0093-691X(99)00236-8)

577

578 **Heras S, De Coninck DI, Poucke MV, Goossens K, Pascottini OB, Mieuwerburgh FV, Deforce D,**
 579 **De Sutter P, Leroy JLMR, Gutierrez-Adan A, Peelman L & Van Soom A** 2016 Suboptimal culture
 580 conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. *BMC*
 581 *Genomics* **17**:72 1-15. (doi: 10.1186/s12864-016-2393-z)

582

583 **Jamnongjit M, Gill A & Hammes SR** 2005 Epidermal growth factor receptor signaling is required for
 584 normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *PNAS* **102** 16257-16262. (doi:
 585 10.1073/pnas.0508521102)

586

587 **Lee CH, Olson P & Evans RM** 2003 Minireview: lipid metabolism , metabolic diseases, and
 588 peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* **144** 2201-2207. (doi: 10.1210/en.2003-
 589 0288)

590

591 **Li HJ, Sutton-McDowall ML, Wang X, Sugimura S, Thompson JG & Gilchrist RB** 2016 Extending
 592 prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant
 593 defence and oocyte quality via gap junctions. *Human Reproduction* **31** 810–821. (doi:
 594 10.1093/humrep/dew020)

595

596 **Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F & Luciano AM** 2007 Large-scale chromatin
 597 remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and
 598 developmental competence. *Mol Reprod Dev* **74** 740–749. (doi: 10.1002/mrd.20639)

599

600 **Mehlmann LM** 2005 Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the
 601 regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* **130** 791-799. (doi:
 602 10.1530/rep.1.00793)

603

Nagyova E 2012 Regulation of cumulus expansion and hyaluronan synthesis in porcine oocyte-cumulus complexes during in vitro maturation. *Endocrine Regulations* **46** 225-235. (doi: 10.4149/endo_2012_04_225)

Nayak G & Cooper GM 2012 p53 is a major component of the transcriptional and apoptotic program regulated by PI 3-kinase/Akt/GSK3 signaling. *Cell Death Dis* **3** e400. (doi: 10.1038/cddis.2012.138)

Négron-Pérez VM, Zhang Y & Hansen PJ 2017 Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. *Reproduction* **154** 627-644. (doi: 10.1530/REP-17-0345)

Pangione S, Hsieh M, Fu M, Persani L & Conti M 2008 Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol Endocrinol* **22** 924-936. (doi: 10.1210/me.2007-0246)

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL & Conti M 2004 EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* **303** 682–684. (doi: 10.1126/Science.1092463)

Perry G 2018 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newslett.* (doi:10.13140/RG.2.2.24793.42087)

Prochazka R, Blaha M & Nemcova L 2012 Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* **144** 535-546. (doi: 10.1530/REP-12-0191)

Prochazka R, Blaha M, Němcová L 2017 Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. *Biology of Reproduction* **97** 537-549. (doi: 10.1093/biolre/iox112)

Razza EM, Sudano MJ, Fontes PK, Franchi FF, Belaz KRA, Santos PH, Castilho ACS, Rocha DFO, Eberlin MN, Machado MF & Nogueira MF 2018 Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus-oocyte complexes and blastocysts. *Reprod Fert Dev* **Apr 23**. (doi: 10.1071/RD17335)

Reizel Y, Elbaz J & Dekel N 2010 Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. *Mol Endocrinol* **24** 402-411. (doi: 10.1210/me.2009-0267)

Rizov M, Andreeva, P & Dimova I 2017 Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwan J Obstet Gynecol* **56** 127-132. (doi: 10.1016/j.tjog.2016.06.019)

Rocha-Frigoni NA, Leão BCS, Nogueira E, Accorsi MF & Mingoti GZ 2014 Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. *Reprod Fert Dev* **26** 797-805. (doi: 10.1071/RD12354)

Sanchez F & Smitz J 2012 Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1822** 1896–1912. (doi: 10.1016/j.bbadis.2012.05.013)

Seidel Jr GE 2006 Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* **65** 228-235. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.025)

Sirard MA 2011 Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet* **28** 483-488. (doi: 10.1007/s10815-011-9554-4)

Sutton-McDowall M, Feil D, Robker RL, Thompson JG & Dunnning KR 2012 Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* **77** 1632-1641. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.12.008)

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F 2002 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen Biol* **3** RESEARCH0034. (doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034)

Van Den Driesche S, Myers M, Gay E, Thong KJ & Duncan WC 2008 HCG up-regulates hypoxia inducible factor-1 alpha in luteinized granulosa cells: implications for the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod* **14** 455e64. (doi: 10.1093/molehr/gan040)

Van Hoeck V, Leroy JLMR, Alvarez MA, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Schnorbusch K, Bols PEJ, Leese HJ & Sturmey RG 2013 Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights. *Reproduction* **145** 33-44. (doi: 10.1530/REP-12-0174)

Wei CC, Wu K, Gao Y, Zhang LH, Li DD & Luo Z 2017 Magnesium reduces hepatic lipid accumulation in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and modulates lipogenesis and lipolysis via PPARA, JAK-STAT, and AMPK pathways in hepatocytes. *J Nutr* **147** 1070-1078. (doi: 10.3945/jn.116.245852)

Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Nakagawa Y, Ide T, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Gotoda T, Nagai R, Kimura S, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N 2003 p53 activation in adipocytes of obese mice. *J Biol Chem* **278** 25395-25400. (doi: 10.1074/jbc.M302364200)

Zhang W, Chen Q, Yang Y, Liu W, Zhang M, Xia G & Wang C 2014 Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. *Mol Reprod Dev* **81** 1030-1041. (doi: 10.1002/mrd.22424)

11. Figure legends

Figure 1. Schematic representation of the experimental design.

Figure 2. Apoptotic rates in D7 blastocysts obtained after *in vitro* fertilization of bovine oocytes submitted or not to meiosis block by inhibition of EGFR for 8 h followed by IVM for 22 h. * The asterisk above the bar denotes significant difference between treatments ($P < 0.05$).

Figure 3. Lipid content of bovine blastocysts stained with the lipophilic dye Nile Red. Representative images of embryos produced from cumulus–oocyte complexes after standard IVM (Control) and after prematuration for 8 h with AG1478 followed by 22 h IVM (EGFR-), evaluated on D7 (A) and D9 (B). Red dots indicate cytoplasmic lipid droplets. Magnification: 20X. (C) Linear regression analysis of embryonic lipid content from D7 to D9. In addition, within each specific time of development (blastocysts in D7 or hatched blastocysts in D9), embryos of both groups were compared by Student's t test and no differences were observed between treatments ($P > 0.05$). Values in the graph, in arbitrary fluorescence, are expressed as the mean of 4 replicates.

Figure 4. Differentially expressed genes in bovine D7-blastocysts produced *in vitro* after fertilization of bovine oocytes submitted or not to meiosis block by inhibition of EGFR for 8 h followed by IVM for 22 h. Data (mean $\pm$ SEM of 4 replicates) are presented as fold-change relative to Control group. * Asterisks above the bars denote significant difference between treatments ($P < 0.05$).

Figure 5. Downstream analysis of EGFR inhibition induced transcript factors. (A) Downstream analysis of genes related to molecules from Mek group. (B) Downstream analysis of genes regulated by PPARA. (C) Downstream analysis of TP53 regulation. (D) Downstream analysis of EGFR. (E) IPA legend of molecule predicted activation (MAP) analysis. (F) IPA legend of network shapes.

Figure 6. Downstream analysis of NANOG related functions which were differentially expressed between Control and EGFR- groups. Function color intensity indicates increased (red) or decreased

(blue) expression in EGFR- compared to Control group. The indirect relationships between NANOG and the functions are indicated by dashed connecting lines.

Figure 7. Ingenuity pathway interaction network analysis. Genes involved in lipid metabolism pathways which were differentially expressed between Control and EGFR- groups. Gene color intensity indicates increased (red) or decreased (blue) fold changes in EGFR- compared to Control group. The indirect relationships between molecules are indicated by dashed connecting lines.

12. Tables

Table 1. Bovine genes evaluated by RT-qPCR in this study

Gene symbol	Gene name	Thermo Fisher ID
<i>ACACA</i>	Acetyl-CoA carboxylase	Bt03213389_m1
<i>ACAT1</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase 1	Bt03238649_g1
<i>ACSL1</i>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Bt03248469_m1
<i>ACSL3</i>	Acyl-CoA Synthetase 3	Bt04282138_m1
<i>ACTB</i>	Actin, beta	Bt03279174_g1
<i>AGPAT1</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	Bt03224587_g1
<i>AKR1B1</i>	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member B1	Bt03218049_g1
<i>AQP3</i>	Aquaporin 3	Bt03253663_m1
<i>ATF4</i>	Activating transcription factor 4	Bt03221057_m1
<i>ATP1B4</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 4 polypeptide	Bt03265072_m1
<i>ATP5L</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex subunit E	Bt03210836_g1
<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin	Bt03251628_m1
<i>BAX</i>	BCL2-Associated X Protein	Bt03211777_g1
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	Bt04298952_m1
<i>BID</i>	BH3 interacting domain death agonist	Bt03241255_m1
<i>CASP3</i>	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Bt03250954_g1
<i>CASP9</i>	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	Bt04282453_m1
<i>CD36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	Bt03212335_mH
<i>CDX2</i>	Homeobox protein CDX-2	Bt03649157_m1
<i>CLIC3</i>	Chloride Intracellular Channel 3	Bt03263038_m1
<i>CPT1B</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1B	Bt03244645_m1
<i>CPT2</i>	Carnitine palmitoyltransferase 2	Bt03233823_m1
<i>DDIT3</i>	DNA-damage-inducible transcript 3	Bt03251320_g1
<i>DGAT1</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	Bt03251719_g1
<i>ELOVL1</i>	ELOVL fatty acid elongase 1	Bt03286627_s1
<i>ELOVL2</i>	ELOVL fatty acid elongase 2	Bt03256849_m1
<i>ELOVL3</i>	ELOVL fatty acid elongase 3	Bt04311306_g1
<i>ELOVL4</i>	ELOVL fatty acid elongase 4	Bt03270721_m1
<i>ELOVL5</i>	ELOVL fatty acid elongase 5	Bt03235956_m1
<i>ELOVL6</i>	ELOVL fatty acid elongase 6	Bt00907566_m1
<i>FADS2</i>	Fatty acid desaturase 2	Bt03256255_g1
<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	Bt03210485_m1
<i>FDX1</i>	Ferredoxin 1	Bt03217449_m1
<i>FOXO3</i>	Forkhead box O3	Bt03649334_s1
<i>G6PD</i>	Glucose 6 phosphate deshydrogenase	Bt03649181_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Bt03210912_g1
<i>GPAT3</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	Bt04292093_m1
<i>GPAM</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	Bt03210381_m1
<i>GPX1</i>	Glutathione peroxidase 1	Bt03259217_g1
<i>GPX4</i>	Glutathione peroxidase 4	Bt03259611_m1
<i>GSK3A</i>	Glycogen synthase kinase 3 alpha	Bt03273695_m1
<i>H2AFZ</i>	H2A histone family, member Z	Bt03216346_g1
<i>H3F3A</i>	H3 histone, family 3 ^A	Bt03278804_g1
<i>H3F3B</i>	H3 histone, family 3B (H3.3B)	Bt04319377_g1
<i>HDAC2</i>	Histone deacetylase 2	Bt03244871_m1
<i>HIF1A</i>	Hypoxia inducible factor 1 (transcription factor)	Bt03259341_m1
<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1	Bt04296095_g1
<i>HMOX1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	Bt03218632_m1
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Bt03225311_g1

<i>HSF1</i>	Heat shock transcription factor 1	Bt03249686_m1
<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein 90kDa alpha	Bt03218068_g1
<i>HSPA1A</i>	Heat shock 70kDa protein 1 ^A	Bt03292670_g1
<i>HSPA5</i>	Heat shock protein Family A (Hsp70) member 5	Bt03244880_m1
<i>HSPD1</i>	Heat Shock 60kDa protein 1 ^A	Bt04301470_g1
<i>IFNT</i>	Interferon	Bt03210589_g1
<i>IGF1R</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	Bt03649217_m1
<i>IGFBP2</i>	Insulin-like growth factor binding protein 2	Bt01040719_m1
<i>KEAP1</i>	Kelch-like ECH-associated protein 1	Bt03817661_m1
<i>KRT8</i>	Keratin 8	Bt03225178_g1
<i>LIPE</i>	Lipase, hormone-sensitive (HSL)	Bt03253691_m1
<i>LPL</i>	Lipoprotein lipase	Bt03240493_m1
<i>LUM</i>	Lumican	Bt03211920_m1
<i>MTIF3</i>	Mitochondrial translational initiation factor 3	Bt03231844_m1
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox	Bt03220541_m1
<i>NDUFA1</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A1	Bt03216720_g1
<i>NFE2L2</i>	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	Bt03251880_m1
<i>OTX2</i>	Orthodenticle homeobox 2	Bt04316301_g1
<i>PA2G4</i>	Proliferation-associated 2G4	Bt03211241_g1
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	Bt03225854_mH
<i>PLAC8</i>	Placenta-specific 8	Bt03211579_m1
<i>PLIN2</i>	Perilipin 2	Bt03212182_m1
<i>PLIN3</i>	Perilipin 3	Bt03230537_m1
<i>PNLIPRP2</i>	Pancreatic lipase-related protein 2	Bt03267914_m1
<i>PNPLA2</i>	Patatin-like phospholipase domain containing 2	Bt03234129_g1
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1 (OCT4)	Bt03223846_g1
<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Bt03220821_m1
<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Bt03217547_m1
<i>PPARGC1A</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Bt01016720_m1
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A	Bt03224617_g1
<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin-1	Bt03223684_m1
<i>PRDX3</i>	Peroxiredoxin 3	Bt03214402_m1
<i>REST</i>	RE1-silencing transcription factor	Bt03264681_m1
<i>RPLP0</i>	Ribosomal protein, large, P0	Bt03218086_m1
<i>S100A10</i>	S100 calcium binding protein A10	Bt03215645_m1
<i>S100A14</i>	S100 calcium binding protein A14	Bt03230771_g1
<i>SCD</i>	Stearoyl-CoA desaturase	Bt04307476_m1
<i>SDHA</i>	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	Bt04307509_m1
<i>SLC2A1</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Bt03215314_m1
<i>SLC2A3</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	Bt03259514_g1
<i>SLC2A4</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Bt03215316_m1
<i>SLC2A5</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	Bt03258296_m1
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble	Bt03215423_g1
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Bt03244551_m1
<i>SREBF1</i>	Sterol regulatory element binding transcription f1	Bt03276370_m1
<i>SREBF2</i>	Sterol regulatory element binding transcription f2	Bt04283467_m1
<i>TFAM</i>	Transcription factor A, mitochondrial	Bt03260078_m1

776

777

778

779

780

Table 2. Embryonic development and total number of cells in embryos obtained after *in vitro* fertilization of bovine oocytes submitted or not to meiosis block by inhibition of EGFR for 8 h followed by IVM for 22 h

Group*	% Cleavage	% Blastocyst **	% Hatching ***	Total number of cells	
	(D3)	(D7)	(D9)	(D7)	(D9)
Control	74.6±3.6	40.6±5.5	79.1±4.8	121.5±7.1	198.9±9.0
EGFR-	68.8±3.8	41.0±3.9	75.6±6.1	116.6±6.3	180.1±6.9

Data are present as the mean ± SEM of 10 replicates (cleavage and blastocysts) and 4 replicates (hatching and cell counting). *Control: IVM for 22 h; EGFR-: preIVM with AG1478 for 8h followed by IVM for 22 h. No differences were found between treatments ($P>0.05$). **Blastocyst rate (D7) was calculated as the percentages of total oocytes subjected to IVM. ***Hatching rate (D9) was calculated as the percentages of total blastocysts.

Table 3. Relative gene expression (ΔCt) on D7 bovine expanded blastocysts obtained after *in vitro* fertilization of bovine oocytes after standard IVM (Control group) and after prematuration for 8 h with an EGFR inhibitor (AG1478) followed by 22 h IVM (EGFR- group)

Gene	Group		P-value
	Control	EGFR-	
Embryo development			
<i>GSK3A</i>	5.03±0.13	5.31±0.08	0.12
<i>HMOX1</i>	8.24±0.41	9.57±0.49	0.08
<i>OTX2</i>	4.41±0.15	4.84±0.18	0.11
<i>PA2G4</i>	2.77±0.13	3.15±0.21	0.19
<i>POU5F1</i>	1.17±0.09	1.45±0.16	0.18
<i>RPLP0</i>	0.24±0.03	0.72±0.15	0.02 *
<i>S100A10</i>	3.36±0.12	3.82±0.18	0.07
<i>S100A14</i>	1.58±0.05	1.95±0.20	0.12
Embryo quality			
<i>ATP5L</i>	1.20±0.08	1.38±0.15	0.33
<i>CLIC3</i>	8.13±0.23	10.31±1.12	0.13
<i>IGF1R</i>	6.23±0.05	6.55±0.13	0.06
<i>IGFBP2</i>	1.07±0.16	1.17±0.19	0.74
<i>KRT8</i>	-1.55±0.11	-0.99±0.24	0.08
<i>MTIF3</i>	8.56±0.05	8.86±0.45	0.69
<i>NANOG</i>	6.68±0.20	7.50±0.21	0.03 *
<i>NDUFA1</i>	4.89±0.65	5.00±0.05	0.87
<i>PRDX1</i>	1.24±0.04	1.53±0.18	0.17
<i>PRDX3</i>	6.42±0.08	6.76±0.22	0.21
<i>REST</i>	3.98±0.24	4.22±0.10	0.89
Differentiation and implantation			
<i>CDX2</i>	4.29±0.06	4.27±0.24	0.93
<i>IFNT</i>	7.40±0.46	8.68±0.27	0.05
<i>PLAC8</i>	12.66±0.39	11.56±0.29	0.09
Epigenetic regulation			
<i>H2AFZ</i>	2.61±0.05	2.88±0.09	0.04 *
<i>H3F3A</i>	4.44±0.16	5.32±0.41	0.09
<i>H3F3B</i>	5.10±0.12	5.28±0.07	0.24
<i>HDAC2</i>	5.39±0.10	5.60±0.26	0.49
Metabolism			
<i>ACACA</i>	5.16±0.03	5.37±0.14	0.20
<i>ACAT1</i>	5.54±0.11	5.89±0.22	0.20
<i>ACSL1</i>	7.41±0.12	7.73±0.03	0.04 *
<i>ACSL3</i>	0.83±0.09	1.11±0.20	0.25
<i>AGPAT1</i>	7.36±0.15	7.98±0.25	0.08
<i>AKR1B1</i>	3.81±0.28	4.52±0.38	0.18
<i>AQP3</i>	1.62±0.07	1.68±0.23	0.80
<i>CD36</i>	10.93±0.41	10.89±0.19	0.92
<i>CPT1B</i>	12.21±0.62	12.82±0.34	0.44
<i>CPT2</i>	6.12±0.10	6.39±0.21	0.28
<i>DGAT1</i>	5.44±0.07	5.65±0.27	0.47
<i>ELOVL1</i>	5.74±0.16	6.25±0.24	0.13
<i>ELOVL2</i>	12.81±0.39	12.07±0.95	0.64
<i>ELOVL4</i>	7.71±0.14	8.10±0.22	0.18
<i>ELOVL5</i>	4.71±0.15	5.02±0.13	0.18
<i>ELOVL6</i>	3.19±0.12	3.06±0.11	0.44
<i>FADS2</i>	3.63±0.22	4.53±0.13	0.01 *
<i>FASN</i>	2.29±0.13	3.04±0.19	0.02 *
<i>FDX1</i>	5.55±0.03	5.91±0.21	0.03 *

<i>G6PD</i>	4.98±0.03	5.02±0.23	0.85
<i>GPAM</i>	7.14±0.08	7.66±0.22	0.07
<i>GPAT3</i>	6.86±0.08	7.71±0.18	0.005 *
<i>HMGCS1</i>	2.53±0.20	3.36±0.17	0.02 *
<i>LIPE</i>	11.71±0.45	12.70±0.47	0.18
<i>LPL</i>	11.64±0.93	12.46±0.72	0.51
<i>PLIN2</i>	4.95±0.19	4.99±0.16	0.86
<i>PLIN3</i>	2.33±0.11	2.67±0.13	0.09
<i>PNPLA2</i>	5.69±0.09	6.27±0.29	0.10
<i>PPARA</i>	12.49±0.54	12.61±0.77	0.90
<i>PPARG</i>	11.42±0.40	13.07±0.22	0.06
<i>PPARGC1A</i>	11.61±0.37	13.03±0.96	0.22
<i>SCD</i>	3.68±0.19	4.30±0.29	0.13
<i>SLC2A1</i>	2.42±0.06	2.51±0.14	0.89
<i>SLC2A3</i>	2.72±0.07	3.10±0.23	0.11
<i>SLC2A4</i>	9.24±0.22	9.86±0.39	0.21
<i>SLC2A5</i>	1.81±0.21	1.92±0.11	0.69
<i>SREBF1</i>	6.26±0.09	6.21±0.33	0.88
<i>SREBF2</i>	4.05±0.16	4.44±0.24	0.23
Apoptosis			
<i>BAX</i>	3.43±0.04	3.73±0.21	0.20
<i>BCL-2</i>	12.14±0.53	13.28±0.60	0.28
<i>BID</i>	6.96±0.08	7.63±0.23	0.03 *
<i>CASP3</i>	8.96±0.22	9.20±0.35	0.89
<i>CASP9</i>	6.70±0.13	6.94±0.50	0.66
Oxidative stress			
<i>FOXO3</i>	8.21±0.04	8.21±0.15	0.98
<i>KEAP1</i>	5.93±0.04	6.17±0.16	0.20
<i>TFAM</i>	6.52±0.06	6.72±0.18	0.34
Endoplasmic reticulum stress			
<i>ATF4</i>	3.33±0.10	3.73±0.15	0.07
<i>DDIT3</i>	6.27±0.11	6.50±0.41	0.61
Stress response			
<i>GPX1</i>	2.46±0.11	2.45±0.14	0.93
<i>GPX4</i>	5.09±0.18	5.79±0.13	0.02 *
<i>HIF1A</i>	7.86±0.07	8.52±0.19	0.02 *
<i>HSF1</i>	4.31±0.08	4.30±0.20	0.95
<i>HSP90AA1</i>	0.78±0.06	1.07±0.20	0.21
<i>HSPA1A</i>	8.40±0.17	8.26±0.37	0.75
<i>HSPA5</i>	2.21±0.14	2.68±0.30	0.21
<i>HSPD1</i>	3.00±0.11	3.14±0.19	0.69
<i>NFE2L2</i>	6.72±0.22	7.24±0.17	0.10
<i>SOD1</i>	5.02±0.05	5.21±0.26	0.51
<i>SOD2</i>	7.72±0.47	7.87±1.12	0.89

809

810

811

812

813

Table 4. Canonical pathways that were significantly ($P < 0.05$) activated in D7 blastocysts obtained after *in vitro* fertilization of bovine oocytes submitted or not to meiosis block by inhibition of EGFR for 8 h followed by IVM for 22 h

Ingenuity Canonical Pathways	P-value	Differentially expressed genes
TR/RXR activation	0.01	FASN, HIF1A
Palmitate biosynthesis I (animals)	0.01	FASN
Fatty acid biosynthesis initiation II	0.01	FASN
Embryonic stem cell differentiation into cardiac lineages	0.04	NANOG
Ketogenesis	0.04	HMGCS1
Oleate biosynthesis II (animals)	0.04	FADS2
Melavonate pathway I	0.04	HMGCS1
Granzyme B signaling	0.04	BID
Y-linolenate biosynthesis II (animals)	0.04	FADS2
Superpathway of geranylgeranyldiphosphate biosynthesis I (via melavonate)	0.04	HMGCS1
Molecular mechanisms of cancer	0.04	BID, HIF1A
Tumoricidal function of hepatic natural killer cells	0.04	BID
Glutathione redox reactions I	0.04	GPX4
CDP-diacylglycerol biosynthesis I	0.04	GPAT3
Phosphatidylglycerol biosynthesis II (non-plastidic)	0.04	GPAT3
Superpathway of cholesterol biosynthesis	0.04	HMGCS1
Cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptosis of target cells	0.04	BID
TWEAK signaling	0.04	BID
Role of PKR in interferon induction and antiviral response	0.04	BID
Stearate biosynthesis I (animals)	0.04	FASN
Role of Oct4 in mammalian embryonic stem cell pluripotency	0.04	NANOG
Triacylglycerol biosynthesis	0.04	GPAT3
TNFR1 signaling	0.04	BID
Docosahexaenoic acid (DHA) signaling	0.04	BID
CD27 signaling in lymphocytes	0.04	BID
Transcriptional regulatory network in embryonic stem cells	0.04	NANOG
Induction of apoptosis by HIV1	0.047	BID
Retinoic acid mediated apoptosis signaling	0.047	BID

Ingenuity pathway analysis (IPA) of canonical pathways by Benjamini-Hochberg correction for multiple testing.

13. Figures

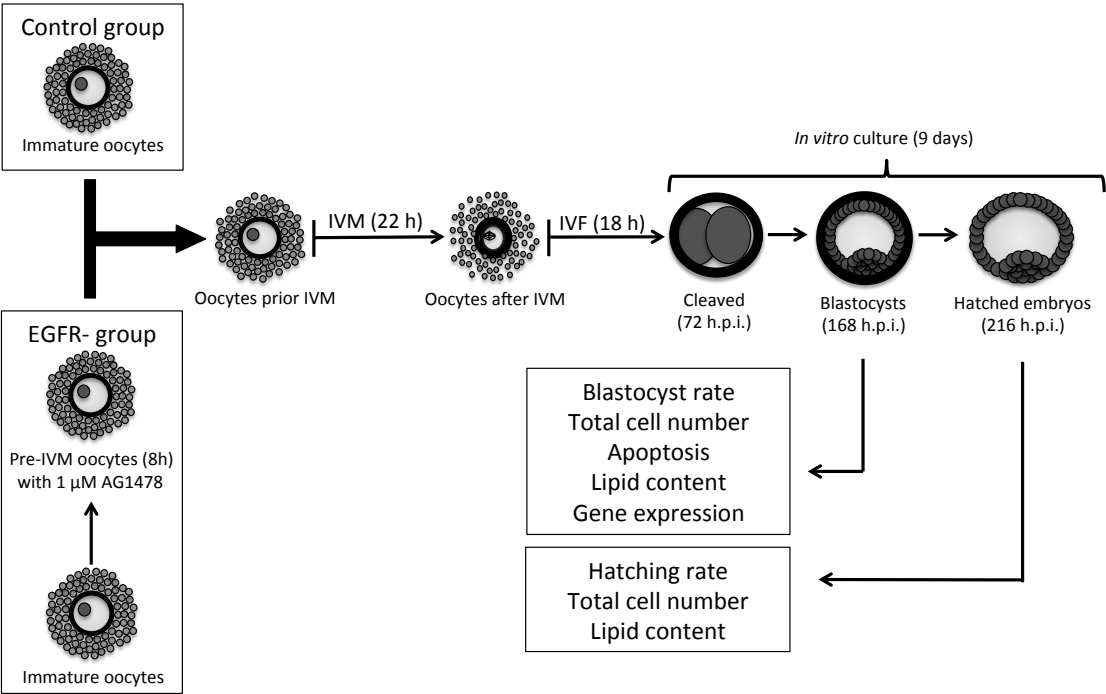
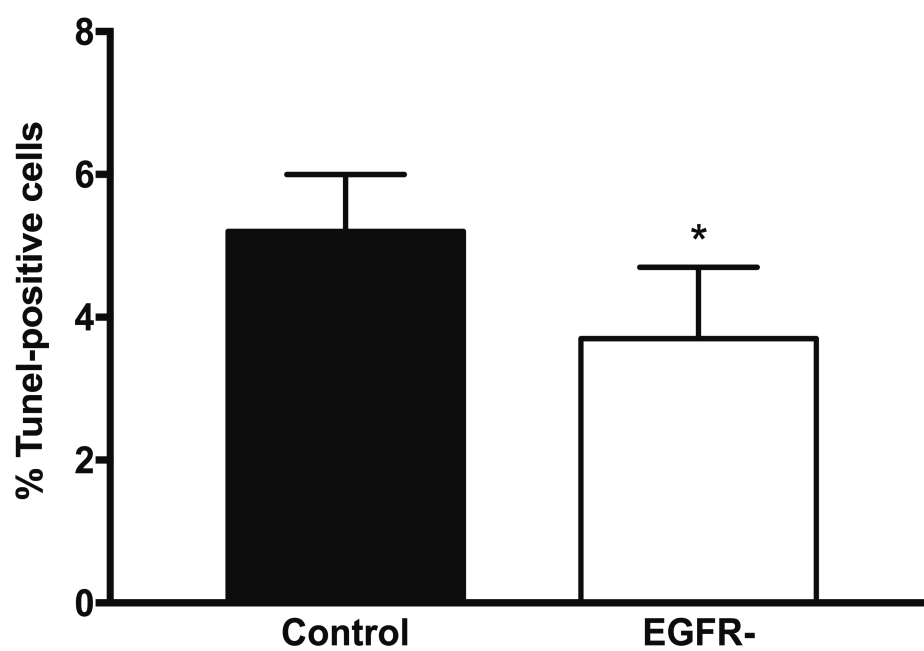
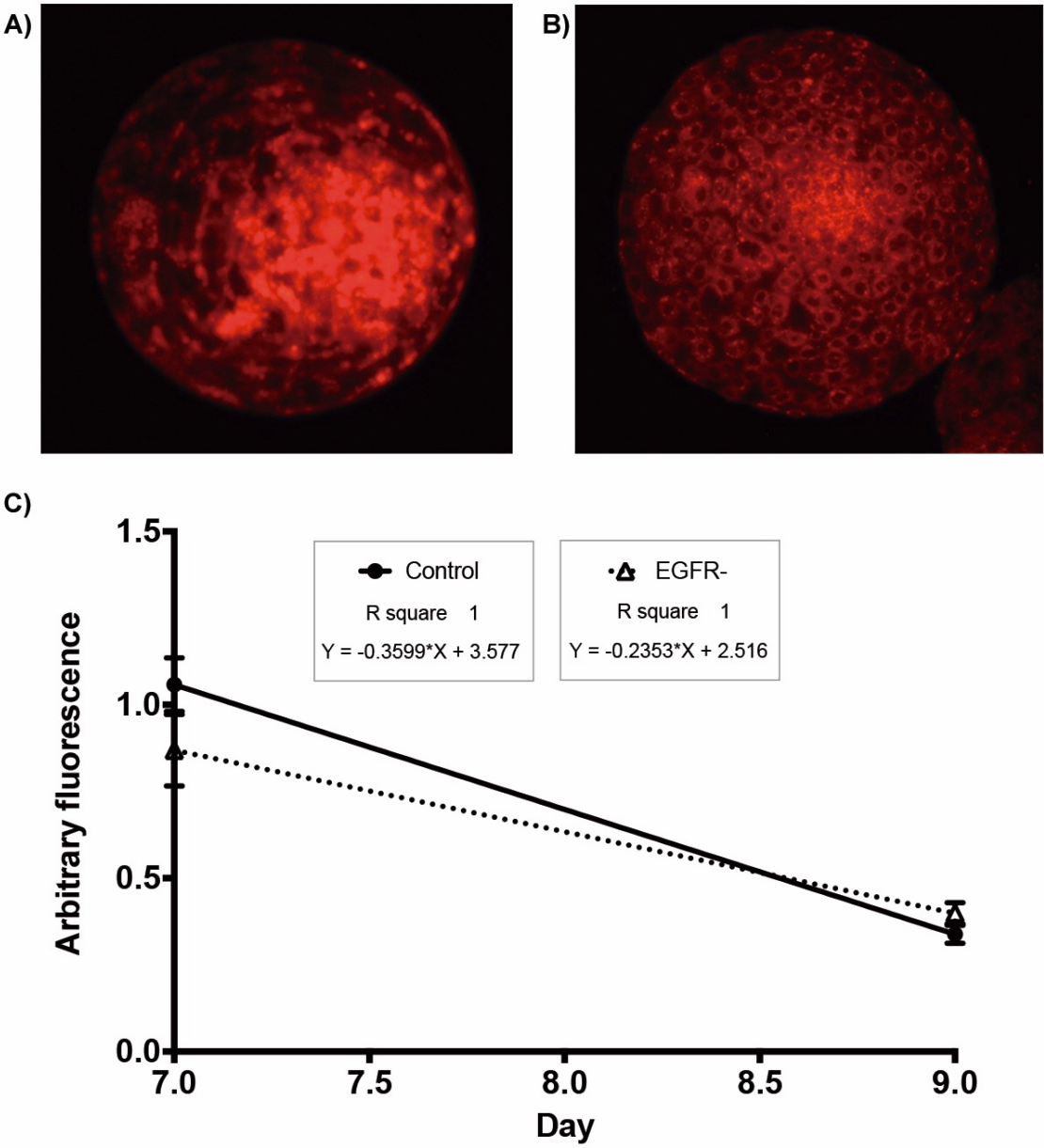


Figure 1



834

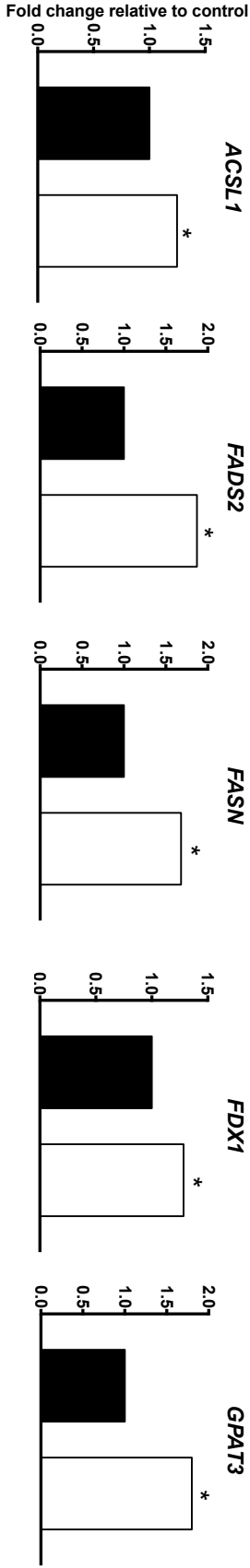
835 Figure 2



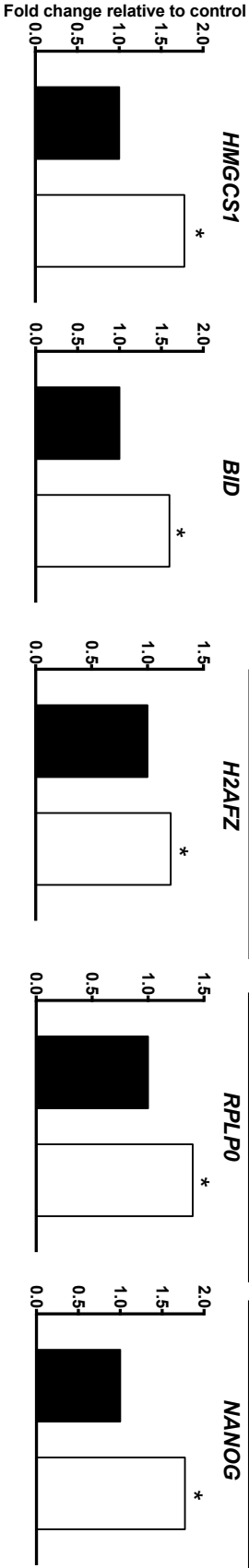
836

837 Figure 3

Lipid metabolism



Metabolism



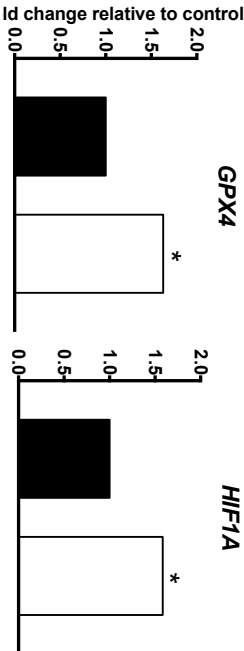
Apoptosis

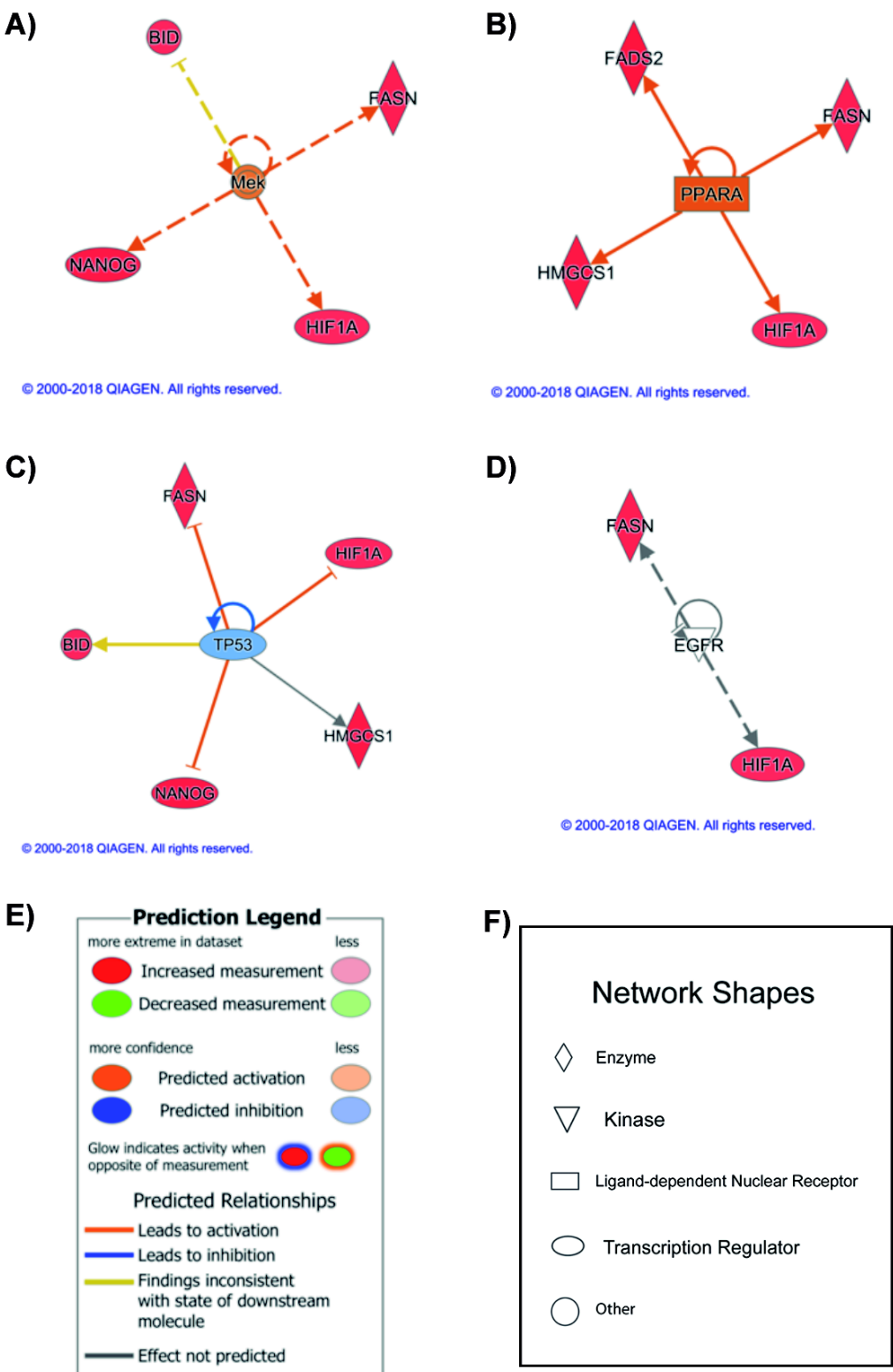
Epigenetic regulation

Embryo development

Embryo quality

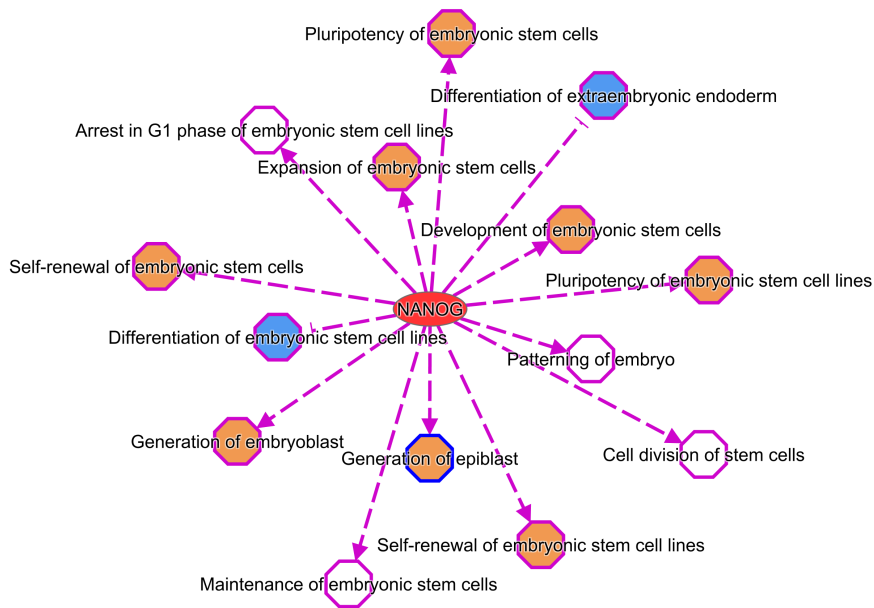
Stress response





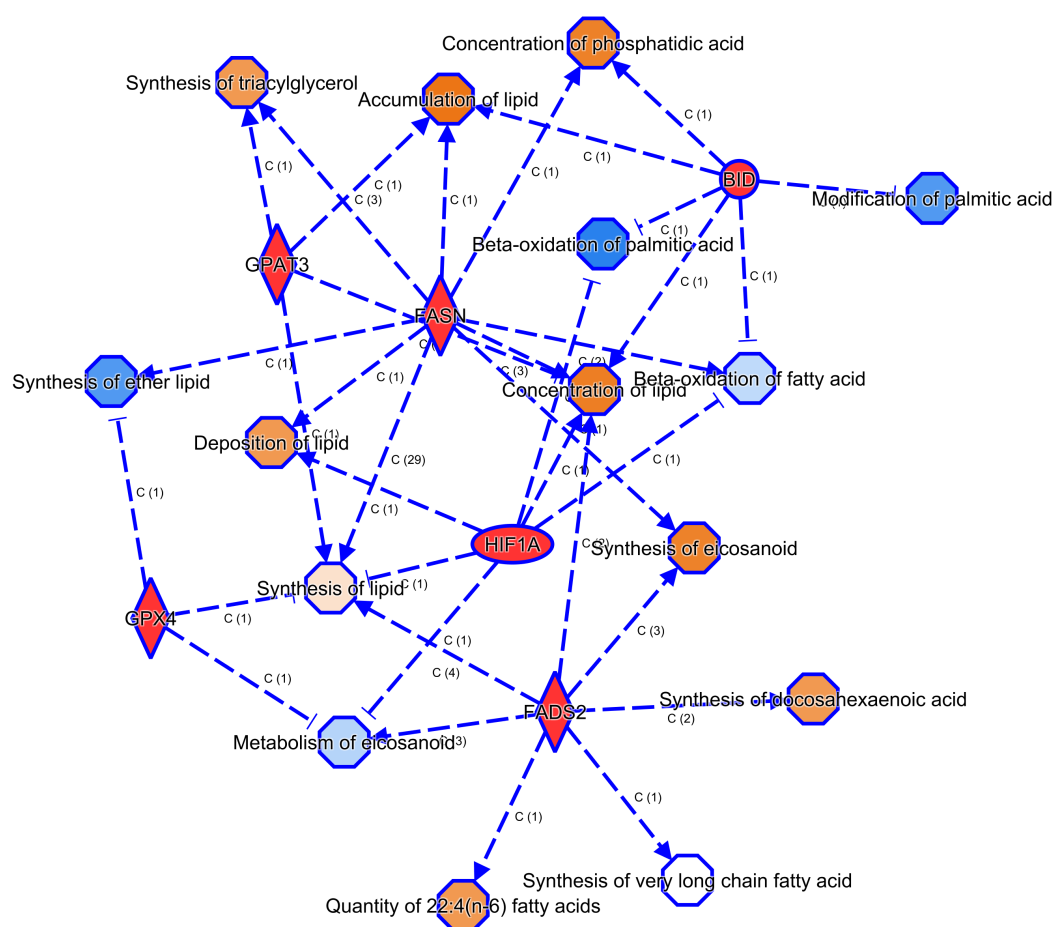
840

841 Figure 5



842 © 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

843 Figure 6



844 © 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

845 Figure 7