

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/08/2020.

**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.

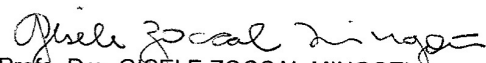
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

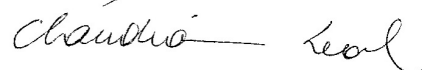
ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

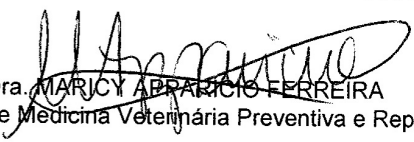
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


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.

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, Smitz 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

- 604 **Nagyova E** 2012 Regulation of cumulus expansion and hyaluronan synthesis in porcine oocyte-
 605 cumulus complexes during in vitro maturation. *Endocrine Regulations* **46** 225-235. (doi:
 606 10.4149/endo_2012_04_225)
 607
- 608 **Nayak G & Cooper GM** 2012 p53 is a major component of the transcriptional and apoptotic program
 609 regulated by PI 3-kinase/Akt/GSK3 signaling. *Cell Death Dis* **3** e400. (doi: 10.1038/cddis.2012.138)
 610
- 611 **Négron-Pérez VM, Zhang Y & Hansen PJ** 2017 Single-cell gene expression of the bovine blastocyst.
 612 *Reproduction* **154** 627-644. (doi: 10.1530/REP-17-0345)
 613
- 614 **Pangione S, Hsieh M, Fu M, Persani L & Conti M** 2008 Luteinizing hormone signaling in
 615 preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol*
 616 *Endocrinol* **22** 924-936. (doi: 10.1210/me.2007-0246)
 617
- 618 **Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL & Conti M** 2004 EGF-like growth factors as mediators of LH
 619 action in the ovulatory follicle. *Science* **303** 682–684. (doi: 10.1126/Science.1092463)
 620
- 621 **Perry G** 2018 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo*
 622 *Transfer Newslett.* (doi:10.13140/RG.2.2.24793.42087)
 623
- 624 **Prochazka R, Blaha M & Nemcova L** 2012 Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-
 625 induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* **144** 535-546. (doi:
 626 10.1530/REP-12-0191)
 627
- 628 **Prochazka R, Blaha M, Němcová L** 2017 Significance of epidermal growth factor receptor signaling
 629 for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. *Biology of*
 630 *Reproduction* **97** 537-549. (doi: 10.1093/biolre/iox112)
 631

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)