

THAÍS DE ARAÚJO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS E DE microRNAs NO
DESENVOLVIMENTO DA COMPETÊNCIA DE OÓCITOS DE VACAS DA RAÇA
GIR (*Bos taurus indicus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Simone Eliza F. Guimarães
Coorientador: Walmir da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A663p
2023

Araújo, Thaís de, 1992-
Perfil de expressão de transcritos e de microRNAs no desenvolvimento da competência de oócitos de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) / Thaís de Araújo. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (44 f.): il.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Medicina Veterinária, 2023.

Referências bibliográficas: f. 36-44.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.348>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Gir (Bovino) - Melhoramento genético. 2. Gir (Bovino) - Seleção. 3. Gir (Bovino) - Reprodução. 4. MicroRNAs .
I. Guimarães, Simone Eliza Facioni, 1966-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.
III. Título.

CDD 22. ed. 636.2910821


THAÍS DE ARAÚJO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS E DE microRNAs NO
DESENVOLVIMENTO DA COMPETÊNCIA DE OÓCITOS DE VACAS DA RAÇA
GIR (*Bos taurus indicus*)**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 THAIS DE ARAUJO
Data: 14/06/2023 17:01:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Thaís de Araújo
Autora

Documento assinado digitalmente
 SIMONE ELIZA FACIONI GUIMARAES
Data: 15/06/2023 07:36:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Simone Eliza Facioni Guimarães
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Raquel Maria Amaral Araújo, pelo amor, apoio e ensinamentos a mim repassados.

Ao Cláudio Teixeira Lombardi, pelo apoio e companhia sempre.

Ao meu irmão Mateus, por sempre torcer e apoiar minhas decisões e conquistas.

Ao Nilon, meu companheiro de vida, pelo amor, apoio e paciência ao longo da nossa caminhada.

A todos os familiares e amigos, pela torcida.

A professora Simone Eliza Facione Guimarães pela oportunidade de ser sua orientada, pelos ensinamentos, atenção e apoio durante todo o processo de aprendizado e execução do projeto.

Ao professor José Domingos Guimarães, pelo aprendizado, paciência e colaboração durante as coletas.

Aos pesquisadores Marta Fonseca Martins e Luiz Gustavo Siqueira, por terem concedido a oportunidade e todos os meios para que este trabalho fosse realizado na Embrapa Gado de Leite, pelo exemplo de profissional, orientação e ensinamentos passados.

Ao Walmir por todos os ensinamentos, sempre acompanhado de muita leveza tornado a convivência mais agradável.

Aos estagiários do Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da UFV, pela ajuda durante o trabalho, pela companhia e alegria de sempre.

As bolsistas de iniciação científica Stela e Raíssa e ao doutorando Hyago e Robert pela ajuda e apoio durante as coletas e processamento das amostras.

Ao João pela amizade e ajuda nas incansáveis dinâmicas foliculares, pelo apoio e troca de conhecimentos.

A equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV, Isabela, Mateus, Christian, Renato e Marta por contribuírem com o trabalho, sempre dispostos a ajudar.

À Embrapa Gado de Leite pela cessão dos animais, instalações, materiais e equipe de apoio para a realização do experimento.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade de realizar a pós- graduação .

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto “Análise global do interactoma miRNA–transcritos para identificação de micro RNAs como marcadores para o desenvolvimento e a maturação oocitária em programas PIVE na raça Gir” - Processo 402935/2021-7.

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

“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que
você faz com aquilo que você sabe”.

(Aldous Huxley)

RESUMO

ARAÚJO, Thaís de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Perfil de expressão de transcritos e de microRNAs no desenvolvimento da competência de oócitos de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*)**. Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães. Coorientador: Walmir da Silva.

O gado Gir possui alto desempenho e tem sido sistematicamente selecionado no Brasil, utilizando ferramentas de seleção fenotípica. Atualmente, critérios de seleção para programas de melhoramento genético estão sendo aplicados visando melhor desempenho em características produtivas e reprodutivas, como a produção de embriões *in vitro*. A presença de miRNAs tem sido estudada e confirmada em todos os tecidos reprodutivos, tipos de células e fluídos biológicos, sinalizando importante papel na gametogênese e no desenvolvimento embrionário. De fato, há evidências acumuladas nos últimos anos sobre a expressão diferencial de miRNAs em diferentes estágios de desenvolvimento folicular, oocitário e embrionário e sua associação com o desenvolvimento normal de gametas e embriões. Mudanças no crescimento e na diferenciação de células da granulosa (GCs) e células do cumulus (CCs) durante a foliculogênese podem afetar diretamente o processo de maturação dos oócitos e o entendimento destes mecanismos pode ser uma ferramenta promissora para a seleção de oócitos de melhor qualidade. Diante disso, as hipóteses do trabalho são: 1) há miRNAs envolvidos no mecanismo de competência oocitária, 2) os genes *BMP15*, *GDF9*, *NPPC*, *GJ1*, *GPR3* e *GJ4*, regulam o mecanismo de competência oocitária. Para início das coletas, 4 vacas da raça Gir foram submetidas a protocolos de sincronização estral. A partir de então, estas fêmeas eram semanalmente aspiradas até se obter 6 oócitos de cada animal, juntamente com fluído folicular, GCs e complexo cumulus-oócito (CCO). Após as aspirações os CCOs eram levados a laboratório, classificados morfológicamente, e incubados com 20 µl do corante Azul Brilhante Cresil (BCB) diluído em PBS na concentração de 26 µM por 1h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, e temperatura de 38°C . As GCs foram separadas do fluído folicular pelo processo de centrifugação. O CCO após a coloração, foi classificado em BCB- e BCB+. Tanto GCs quanto fluído folicular e CCOs foram estocados em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído conjuntamente de fluído folicular, GCs e CCOs para cada vaca e a expressão dos genes *NPPC*, *BMP15*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* e *GPR3* e dos miRNAs correlacionados com os genes alvos, bta-

mirR 138 (gene *NPPC*) e bta-miR 193a-5p (gene *GPR3*), foi avaliada por qPCR. O Test- *t* foi utilizado para comparar as médias dentro de cada tratamento (BCB+ e BCB-) para genes e miRNA. Os resultados foram considerados significativos quando atingido o valor de $P < 0,05$. Os genes *NPPC*, *BMP15*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* e *GPR3* não apresentaram diferenças significativas na sua expressão entre os tratamentos BCB+ e BCB-, enquanto ambos miRNAs apresentaram diferença significativa na sua expressão. Esses resultados podem ser explicados pela fase do ciclo estral em que os animais tiveram seus folículos ovarianos aspirados não havendo diferenças na expressão dos genes relacionados a competência oocitária, ou mesmo pelo tamanho dos foclículos aspirados, entre 4 a 8 mm, denotando sua maturação. Outra explicação seria a ativação de diferentes vias gênicas, levando a competência oocitária, diferente da que foi analisada neste projeto. Quanto aos miRNAs foi possível observar a relação de ambos no desenvolvimento da competência oocitária controlando a expressão pós transcricional dos genes analisados *NPPC* e *GPR3*, não obstante não se pode descartar a possibilidade destes miRNAs estarem controlando outros transcritos, visto que miRNAs são conhecidos por serem moléculas multi-alvos. Estes achados indicam a necessidade de estudos futuros, nos quais o papel de reguladores de transcrição de ambos os miRNAs deverá ser validado pela análise de expressão para as proteínas Natriuretic Peptide C (*NPPC*) e G Protein-Coupled Receptor 3 (*GPR3*).

Palavras-chave: miRNA. Competência oocitária. Maturação.

ABSTRACT

ARAÚJO, Thaís de, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Expression profile of transcripts and microRNAs in the development of competence in oocytes from Gir cows (*Bos taurus indicus*)**. Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-adviser: Walmir da Silva.

Gyr cattle have high performance and have been systematically selected in Brazil, using phenotypic selection tools. Currently, selection criteria for genetic improvement programs are being applied aiming at better performance in productive and reproductive traits, such as *in vitro* embryo production. The presence of miRNAs has been studied and confirmed in all reproductive tissues, cell types and biological fluids, indicating an important role in gametogenesis and embryonic development. In fact, there are several evidences accumulated in recent years on the differential expression of miRNAs at different stages of follicular, oocyte and embryonic development and their association with the normal development of gametes and embryos. Changes in the growth and differentiation of granulosa cells (GCs) and cumulus cells (CCs) during folliculogenesis may directly affect the oocyte maturation process and the understanding of these mechanisms can be a promising tool for the selection of better-quality oocytes. Therefore, the hypotheses of this work are: 1) there are miRNAs involved in the oocyte competence mechanism; 2) the genes *BMP15*, *GDF9*, *NPPC*, *GJ1*, *GPR3* and *GJ4* regulate the oocyte competence mechanism. To start the collections, 4 Gir cows were submitted to estrous synchronization protocols. From then on, these females were aspirated weekly until 6 oocytes were obtained from each animal, together with follicular fluid, GCs and cumulus-oocyte complex (CCO). After the aspirations, the COCs were taken to the laboratory, morphologically classified, and incubated with 20 µl of Cresyl Brilliant Blue dye (BCB) diluted in PBS at a concentration of 26 µM for 1 h in an oven with an atmosphere of 5% CO₂ in air, and temperature of 38°C. GCs were separated from the follicular fluid by the centrifugation. The CCO after staining was classified into BCB- and BCB+. Both GCs and follicular fluid and COCs were stored in liquid nitrogen. Total RNA was extracted together from follicular fluid, GCs and COCs for each cow and the expression of the *NPPC*, *BMP15*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* and *GPR3* genes and the miRNAs correlated with the target genes, bta-miR 138 (*NPPC* gene) and bta-miR 193a-5p (*GPR3* gene), was evaluated by qPCR. The t-Test was used to compare means within each treatment (BCB+ and BCB-) for genes.

Results were considered significant when $P < 0.05$ was reached. The *NPPC*, *BMP15*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* and *GPR3* genes did not show significant differences in their expression between BCB+ and BCB- treatments, while both miRNAs showed significant difference in their expression. These results can be explained by the phase of the estrous cycle in which the animals had their ovarian follicles aspirated, with no differences in the expression of genes related to oocyte competence, or even by the size of the aspirated follicles, between 4 and 8 mm, denoting their maturation. Another explanation would be the activation of different gene pathways, leading to oocyte competence, different from what was analyzed in this project. As for the miRNAs, it was possible to observe the relationship of both in the development of oocyte competence by controlling the post-transcriptional expression of the analyzed genes *NPPC* and *GPR3*, however, the possibility of these miRNAs controlling other transcripts cannot be discarded, since miRNAs are known to be molecules multi targets. These findings indicate the need for future studies, in which the role of transcriptional regulators of both miRNAs should be validated by expression analysis for Natriuretic Peptide C (*NPPC*) and G Protein-Coupled Receptor 3 (*GPR3*) proteins.

Keywords: miRNA. Oocyte competence. Maturation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Maturação oocitária e sua avaliação	13
2.2. Via das pentoses fosfato no oócito	15
2.3 Vias de Sinalização da competência e maturação oocitária	16
2.4. Biogênese do microRNA e sua participação na maturação dos oócitos	18
2.5. Papel dos miRNAs extracelulares na regulação da fertilidade nas fêmeas.....	20
2.6. Os miRNAs como marcadores da competência de desenvolvimento do oócito	21
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
3.1. Justificativa.....	22
3.2. Objetivo geral	22
3.3. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Ética	23
4.2. Local e Animais	23
4.3. Aspiração Folicular (<i>Ovum pick-up</i> - OPU) adaptado	23
4.4. Classificação e Separação do Complexo Cúmulus-Oócito	24
4.5. Coloração do CCO com Azul Cresil Brilhante (BCB)	25
4.6. Recuperação das células da granulosa e do fluido folicular	25
4.7. Extração de RNA total	26
4.9. Síntese de cDNA.....	26
4.10 Seleção de alvos para análise de expressão gênica	27
4.11. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....	29
4.12. ANÁLISE DE DADOS.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Expressão Gênica dos Genes Alvo	30
5.2. Expressão dos miRNAs	33
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A raça Gir (*Bos indicus*) foi importada da Índia pela primeira vez para o Brasil em 1850 (Meirelles et al., 1999). O gado Gir possui alto desempenho e tem sido desde então selecionado no Brasil utilizando-se ferramentas de seleção fenotípica. A raça vem sendo sistematicamente aprimorada para características de produção e reprodução, mantendo altas habilidades adaptativas (Maiorano et al., 2018; Nagib Nascimento et al., 2019). A utilização de características reprodutivas, como o número de oócitos como critério de seleção para programas de melhoramento genético em bovinos leiteiros, pode levar ao melhor desempenho na produção de embriões *in vitro* e maior retorno econômico para o setor produtivo, uma vez que existe variação genética para essas características (Vizoná et al., 2020). Outro fator que pode levar ao melhor desempenho na produção de embriões *in vitro*, é a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na maturação oocitária que interferem na competência do oócito e no desenvolvimento do embrião.

Os mecanismos biológicos de desenvolvimento são finamente regulados pela expressão espaço-temporal de múltiplos genes, compreendendo eventos transcricionais e pós-transcricionais, como processamento, transcrição e tradução das moléculas de RNA mensageiro (mRNA). O papel dos eventos pós-transcricionais na regulação do desenvolvimento foi destacado com a descoberta de RNAs não codificantes, incluindo microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são moléculas de RNA de fita simples que regulam a expressão de genes pela formação de estruturas semi-complementares entre mRNA e miRNAs em regiões 3' não traduzidas (3'UTR). Este processo leva à degradação dos mRNAs alvo ou inibição de sua tradução via interação com fatores de iniciação de tradução (Ambros, 2004). Cada miRNA tem centenas de alvos potenciais devido à ligação semi-complementar aos mRNAs. Este recurso fornece aos miRNAs uma complexa e intrincada capacidade de afetar a tradução de mRNAs e conseqüentemente, a função de vários tipos de células (Ambros, 2004).

A presença de miRNAs foi confirmada em todos os tecidos reprodutivos, tipos de células e fluidos biológicos, indicando seu importante papel na gametogênese e no desenvolvimento embrionário (Moreno-Moya, Vilella e Simón, 2014). De fato, há muitas evidências acumuladas nos últimos anos sobre a expressão diferencial de miRNAs em diferentes estágios de desenvolvimento folicular, oocitário e embrionário

e associação dessas mudanças na expressão de miRNA com o desenvolvimento normal de gametas e embriões. Vários distúrbios reprodutivos, incluindo síndrome do ovário policístico, infecções uterinas e anormalidades da gravidez, estão associadas à desregulação da expressão de miRNAs (Li et al., 2015). Além disso, muitos miRNAs foram detectados recentemente no ambiente extracelular, incluindo fluido folicular e meios de cultura de células, principalmente encapsulados em vesículas - exossomos ou microvesículas, o que os torna notavelmente resistentes às condições extracelulares (Silveira et al., 2018; Sallas-Hueto et al., 2019).

Curiosamente, o perfil de expressão dos miRNAs extracelulares em fluidos biológicos é variável, o que indica que os miRNAs são seletivamente liberados das células em resposta às condições fisiológicas alteradas ou tratamentos específicos. Essas características os tornam marcadores não invasivos ideais para a avaliação de células somáticas, bem como oócitos e qualidade embrionária. Células da granulosa (GCs) e células do cumulus (CCs) exibem um papel importante na regulação da maturação dos oócitos. No final do crescimento do folículo, as GCs desempenham um papel fundamental não apenas no crescimento do oócito, mas também na secreção de hormônios que regulam a ovulação e garantem que o endométrio está devidamente preparado para implantação (Kossowska-Tomaszczuk & Geyter, 2013). GCs e CCs mantêm seu potencial de se diferenciar em vários outros tipos de células, o que permite que elas exibam várias propriedades; desde suas propriedades endócrinas típicas até a co-formação do leito vascular do corpo lúteo após a ovulação. Mudanças na expressão de genes das GCs ou das CCs podem afetar o crescimento adequado e a qualidade dos oócitos, sua maturação e até mesmo a formação dos embriões. Hoang et al. (2019) indicaram que as células GCs derivadas de folículos menores e imaturos têm maior plasticidade do que aquelas derivadas de folículos maduros. No entanto, as células de todos os folículos, independentemente do tamanho, mostram marcadores de desenvolvimento multipotente, importantes para o correto desenvolvimento embrionário como *Nanog*, *Sox2* e *Oct4*. Outros relatos indicam que GCs expressam marcadores característicos de células-tronco mesenquimais, como *CD90*, *CD44* e *CD105* (Dzafic et al., 2014).

O folículo ovariano deve ser tratado como um nicho de células mais e/ou menos diferenciadas, e a comunicação entre os vários compartimentos foliculares influencia a fertilização correta e a implantação do embrião no endométrio. A maneira convencional de pensamento, onde o folículo ovariano é tratado como uma estrutura

isolada, separada no tempo e no espaço, está sendo abandonada. Cecconi & Rossi (2001) demonstraram que oócitos maduros e competentes de camundongos influenciam o desenvolvimento de folículos pré-antrais e, assim, preservam a ciclicidade dos mecanismos biológicos que ocorrem no ovário. Portanto, presume-se que há populações de células heterogêneas no folículo ovariano, incluindo aquelas como células-tronco (Potten & Loeffler, 1990). Estes autores também sugeriram que GCs primitivas derivam de células epiteliais da superfície ovariana (OSE).

Levando em consideração esses novos fatos sobre GCs presentes no folículo ovariano, uma abordagem muito mais ampla do papel destas células também deve ser levada em conta em relação à transmissão de informações de células somáticas para o oócito. Os mecanismos que ocorrem em GCs podem ter um grande impacto na eficácia do desenvolvimento embrionário e afetam a fertilidade de humanos e animais. Mudanças no crescimento e na diferenciação de GCs e CCs durante a foliculogênese pode afetar diretamente o processo de maturação dos oócitos e o entendimento destes mecanismos pode ser uma ferramenta promissora na melhoria da qualidade oocitária. Portanto, a compreensão da diferenciação de GCs e CCs pode acender uma nova luz sobre os mecanismos de manipulação *in vitro*, reduzindo as perdas oocitárias no processo de maturação e indicando direções de desenvolvimento de metodologias reprodutivas mais eficientes que permitam aumentar e acelerar o ganho genético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Maturação oocitária e sua avaliação

A oogênese é um mecanismo biológico intrincado altamente regulado transcricionalmente e pós transcricionalmente no qual ocorre o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primárias à formação dos oócitos (Hafez e Hafez, 2004). As células germinativas se dividem por mitose, formando as oogônias e posteriormente diferenciam-se em oócitos primários, que após sofrerem a primeira divisão meiótica param em prófase I até serem fecundados (Strączyńska et al., 2022). Essa parada na divisão meiótica permite ao oócito passar pela fase de crescimento e acumular no citoplasma proteínas e mRNA necessários para a maturação e o desenvolvimento embrionário (Jaffe e Jeremy, 2017).

A foliculogênese, por outro lado, corresponde à formação, ao crescimento e à maturação folicular, esse processo inicia-se durante a vida fetal, por volta dos 95 dias de gestação em bovinos (Diniz et al., 2005). A foliculogênese é um mecanismo paralelo que acompanha e suporta a oogênese. O recrutamento, a ativação e o crescimento de folículos ovarianos dormentes são desencadeados pela via de sinalização molecular que leva a supressão de fatores de dormência do folículo resultando no crescimento e na diferenciação, desde folículo primordial, primário, secundário até folículo de Graaf. Em paralelo ao ciclo de crescimento e maturação do folículo, ocorre a diferenciação das GCs, células do cumulus (CCs) e células da corona radiata. O complexo formado pelas três estruturas e o oócito é chamado de complexo cumulus-oócito (CCO) (Strączyńska et al., 2022).

A capacidade de retomada da meiose, com a clivagem após a fertilização e desenvolvimento até o estágio de blastocisto, seguida pela gestação levando a prole a termo com boa saúde, é a definição de competência oocitária (Krisher, 2004; Sirard et al., 2006). Uma série de eventos celulares estão associados à competência do oócito, dentre elas mudanças nucleares, citoplasmáticas e moleculares finamente controladas pela maquinaria de regulação gênica (Mota, 2008). Segundo Gottardi e Mingoti (2009), a maturação oocitária é dividida em três etapas importantes. A etapa de maturação nuclear, que é compreendida pela condensação da cromatina, desaparecimento do nucléolo e fragmentação da membrana celular, ocorrendo o progresso do oócito da fase prófase I da primeira meiose até a metáfase II da segunda divisão meiótica (Kim, 2008). Na fase de maturação citoplasmática as alterações são referentes à distribuição e à organização de organelas celulares e à estocagem de proteínas e RNA (Anguita et al., 2007). Em etapas celulares como formação de pronúcleos, início da embriogênese e fecundação são compreendidos pelo resultado da etapa de maturação celular, onde processos de transcrição e processamento de mRNAs serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos (Gonçalves et al., 2007).

Durante o crescimento e o desenvolvimento do oócito, ele adquire reservas maternas (mRNAs e proteínas) que são essenciais para apoiar o desenvolvimento do embrião nos estágios iniciais de clivagem (Liu et al., 2010). Neste sentido, oócitos em crescimento não possuem completa habilidade de desenvolvimento (Mota, 2008).

Nos últimos anos, as tecnologias de reprodução assistida (ART) alcançaram novos marcos na competência in vitro de oócitos com o intuito de melhorar a implantação no útero e gerar descendentes viáveis (Conti e Franciosi, 2018). Os

métodos que são capazes de predizer, com alguma precisão a qualidade dos oócitos, causam a sua destruição e isso gerou o interesse na identificação de marcadores celulares e moleculares para selecionar o oócito mais competente e gerar embriões com maior potencial de implantação (Ruvolo et al., 2013). Uma dessas abordagens comumente utilizada é a avaliação da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), por meio da coloração Azul Cresil Brilhante (BCB), que avalia a atividade intracelular da G6PDH. Durante a fase de crescimento do oócito a atividade da G6PDH é observada pela demanda de ribose-6-fosfato para a síntese de nucleotídeos. Em oócitos que completaram sua fase de crescimento, a atividade de G6PDH é reduzida (Pujol et al., 2004). Não se sabe ao certo como a enzima G6PDH é capaz de degradar o corante no interior do oócito e deixar seu citoplasma incolor (BCB-)(Alm., et al 2005), enquanto em oócitos onde a atividade da enzima é baixa o citoplasma fica corado de azul (BCB+).

Estudos mostram que oócitos BCB+ têm tendência a maior potencial de desenvolvimento. Silva et al., 2013 relatam taxas melhores de blastocistos no dia 7. Além disso, Fakruzzaman et al., 2013 relatam melhor qualidade de blastocisto, baseado no número total de células apoptóticas e número de mitocôndrias. Salviano et al., 2016 mostraram que durante a maturação *in vitro* (MIV) a co-cultura entre oócitos BCB- e BCB+ afeta negativamente a capacidade de desenvolvimento dos oócitos BCB+ indicando que fatores extracelulares interferem no desenvolvimento oocitário.

O teste BCB mostrou-se uma importante ferramenta para a seleção de oócitos e quando usada em conjunto com a classificação morfológica clássica permite a melhor seleção de oócitos com maior potencial de implantação (Aguila et al., 2020). Contudo a técnica ainda é considerada invasiva, com coloração subjetiva e de baixa especificidade. Assim a busca por biomarcadores como os miRNA promete ser uma revolução no estudo do desenvolvimento oocitário.

2.2. Via das pentoses fosfato no oócito

A glicose possui três destinos principais: 1 - ser armazenada (na forma de polissacarídeos ou sacarose), 2 - oxidada a compostos de três carbonos (piruvato) através da glicólise (ou através da via do fosfogluconato), ou a 3 - via das pentoses fosfato (PPP) e ser oxidada a pentose. A primeira reação da via das pentoses fosfato

é a desidrogenação da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Obtém-se ao final da reação nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e ribose 5-fosfato. Outra função da via das pentoses é gerar açúcares pentoses para a biossíntese do DNA (Lehninger et al., 1995). Esses substratos energéticos (glicose, piruvato, lactato, aminoácidos) no interior do fluído folicular estão disponíveis para o CCO.

O FSH (hormônio folículo estimulante) é responsável por estimular o metabolismo de glicose pelas células do cumulus. A glicólise e a PPP nestas células forneceriam piruvato e NADPH ao oócito.

Oócitos imaturos de roedores apresentaram alta atividade de G6PDH em comparação com outros tecidos, demonstrando seu elevado potencial para a atividade PPP (Tsutsumi et al., 1992). Já a atividade de hexoquinase (via glicolítica) é baixa em oócitos, indicando uma limitada utilização da glicose por essa fase da via glicolítica. A atividade da G6PDH em oócitos bovinos desnudos, foi demonstrada por Cetica et al. (2002), observando que sua atividade é aproximadamente quatro vezes maior do que a atividade de fosfofrutoquinase (via glicolítica). Estes trabalhos demonstram que existe um maior envolvimento da via das pentoses do que enzimas envolvidas na glicólise.

Algumas diferenças observadas nas taxas metabólicas de oócitos de fêmeas pré-púberes e adulta, são em função do tamanho pequeno de oócitos adquiridos de fêmeas pré-púberes. Sendo assim o atraso da geração de NADPH e ribose pode prejudicar o desenvolvimento dos oócitos de animais pré-púberes. (Steeves e Gardner, 1999). Comparando o perfil protéico de oócitos de fêmeas pré-púberes com oócitos oriundos de vacas adultas que param o desenvolvimento embrionário nas fases de mórula e blastocisto, Levesque e Sirada (1994) encontraram o mesmo perfil protéico.

Esses trabalhos sustentam a ideia de que a atividade da enzima G6PDH pode indicar se um oócito atingiu o final de seu crescimento, além do tamanho do oócito ser crítico para a maturação, fertilização e posterior desenvolvimento embrionário.

2.3 Vias de Sinalização da competência e maturação oocitária

Várias vias gênicas estão descritas na literatura sobre a retomada da meiose, competência e maturação oocitária (Straczyńska et al., 2022). Dentre os genes citados nessas vias alguns têm destaque e foram aqui analisados. Dentre estes estão os

genes *BMP15* e *GDF9*, que são classificados como reguladores de fertilidade, sendo produzidos nos oócitos e atuam sobre receptores nas GCs.

A qualidade do oócito e a foliculogênese são afetados pelo *GDF9* e *BMP15*. O gene *GDF9* desempenha papel no desenvolvimento folicular durante a transição do folículo primário para o estágio de folículo secundário. Ele também está envolvido na diferenciação de GC, particularmente na transição de GC pré-antral para CC em camundongos (Diaz et al., 2007). Já o *BMP15* está associado à maturação folicular nas fases independentes de gonadotrofinas, prevenindo a apoptose das GC, regulando a sensibilidade das GC em relação ao FSH, adequando a taxa de ovulação e aumentando a competência de desenvolvimento do oócito (Chang H et al., 2002, Persani et al., 2014, Shimasaki et al., 2004 e Hashimoto et al., 2005).

Outros genes que merecem destaque são o *GJ1* e *GJ4*, que acoplam metabolicamente as células, permitindo a passagem de pequenas moléculas entre elas (Harris, 2001). O microambiente folicular e a sinalização materna via células da granulosa e células do cumulus têm influência importante no crescimento, no desenvolvimento e na aquisição da competência oocitária. A interação entre oócitos e células da granulosa é bidirecional. Fatores de crescimento são secretados pelos oócitos, mais recentemente chamados de fatores secretados por oócitos - OSFs (Gilchrist et al., 2007) ou fator de crescimento derivado do oócito - ODGF (Zhang et al., 2010 e 2011), que interferem diretamente nas células foliculares adjacentes, afetando processos como a foliculogênese. Esta rede de conexões também é muito importante porque a camada de células da granulosa é avascular (Anderson et al., 1976).

O gene *GPR3* faz parte de uma superfamília de receptores de membrana, na maioria dos mamíferos são os receptores acoplados à proteína G - GPCRs (Vassilatis et al., 2003). Os membros desta família transduzem sinais extracelulares como proteínas, lipídeos, íons, hormônios, ferormônios em respostas intracelulares, ativando a proteína G, que irá modular enzimas e canais iônicos (Wess J, 1997). *GPR3* mantém a concentração de cAMP em um nível que garante a parada meiótica na prófase I, até o momento em que o hormônio luteinizante aumenta sua concentração e desencadeie a retomada meiótica (DiLuigi et al., 2008, Vaccari et al., 2008).

O *NPPC* (percursor do peptídeo natriurético tipo C), gene que codifica o peptídeo natriurético tipo C, e o *NPR2* (receptor natriurético 2) afetam a fertilidade feminina por

atuarem na produção de oócitos com capacidade de desenvolvimento, em animais e humanos (Onder Celik et al., 2019). Várias funções fisiológicas estão associadas à via de sinalização *NPPC/NPR2*, como: manutenção da parada meiótica, sobrevivência do folículo e a presença cumulus oophorus funcional (Zhang M et al., 2010; McGee E et al., 1997). A manutenção da parada meiótica em oócitos de mamíferos é desempenhada pela via de sinalização *NPPC/NPR2*, onde mutações em *NPPC* ou *NPR2* resultam na retomada prematura da meiose.

2.4. Biogênese do microRNA e sua participação na maturação dos oócitos

A biogênese do miRNA é um processo complexo, que regula a transcrição e o processamento dos miRNA primários (pri-miRNA) em miRNAs maduros e funcionais. Os miRNAs são transcritos a partir um gene miRNA ou região intergênica pela RNA polímerase II para dar origem ao transcrito pri-miRNA, de aproximadamente 1000 nucleotídeos. A biogênese pode seguir pela via canônica ou não canônica. Seguindo a via canônica, ocorrerá no núcleo a clivagem do pri-miRNA por um complexo enzimático chamado DROSHA/DGCR8, dando origem ao pre-miRNA, com 60-70 nucleotídeos de comprimento. Quando segue pela via não canônica os pré-miRNAs são sintetizados por *splicing* de íntrons do transcrito de mRNA, ignorando a clivagem mediada por DROSHA.

Os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma pela Exportina-5, e clivados pela enzima Dicer, que gera um duplex de miRNA, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento. Uma das fitas complementares será degradada pela proteína Argonata e a outra será incorporada ao complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC). O miRISC reconhece sítios de ligação dentro da região 3' UTR do mRNA alvo, induzindo sua degradação, repressão da tradução da proteína ou deadenilação do mRNA.

A elucidação do papel dos miRNAs na regulação da fertilidade feminina contou com uma ferramenta poderosa, o nocaute condicional de enzimas envolvidas no processamento de miRNA. Camundongos nocaute para a Drosha / DGCR8-, Dicer ou Argonata exibem anormalidades graves em várias funções reprodutivas, incluindo redução na taxa de ovulação, formação de fuso defeituoso e rearranjos cromossômicos em oócitos, aumentando a mortalidade embrionária e o desenvolvimento anormal de todos os órgãos reprodutivos (Tesfaye et al., 2018),

evidenciando, portanto, o importante papel regulador dos miRNA nesses processos biológicos.

Durante a fase de crescimento, os oócitos são mantidos em parada na prófase meiótica, por alta concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos, adenosina monofosfatada cíclica (cAMP) e guanosina monofosfatada cíclica (cGMP). Em resposta ao pico de LH, a concentração de cGMP no folículo pré-ovulatório diminui e o cAMP é rapidamente hidrolisado, levando a liberação do oócito da parada meiótica para a fase M do ciclo celular (Jaffe e Edberg, 2017). Algumas sequências de eventos ocorrem no oócito para que ele chegue à parada metafásica II, tais como: ruptura da membrana nuclear da vesícula germinativa (GV), onde a cromatina torna-se condensada e passa por duas divisões meióticas. Essa sequência é chamada de maturação do oócito e é acompanhada pela expansão das células do cumulus.

A maturação do oócito de mamíferos é dependente de eventos pós-transcricionais, que vão ocorrer no próprio oócito, mas também nos compartimentos somáticos dos folículos, células da granulosa e células do cumulus. Nos últimos cinco anos foi demonstrado que as células da granulosa e do cumulus *in vivo* expressam diferentes miRNAs durante o crescimento folicular, a ovulação e as fases do ciclo estral bem como *in vitro*, durante a cultura do complexo cumulus-oócito. De acordo com Salilew-Wodim et al (2020) a expressão aumentada de três miRNA nas células do cumulus em suínos, leva a expansão prejudicada do cumulus, afetando a progressão do estágio de vesícula germinativa para parada metafásica II. Da mesma forma, miR-375 suprimiu a maturação de oócitos bovinos ao se ligar a *ADAMTS1* e ao receptor de progesterona nas células do cumulus. Por sua vez Sinha et al (2017), encontrou que miR-130b promoveu a maturação de oócitos bovinos regulando a proliferação e a sobrevivência das células da granulosa e do cumulus.

A expressão e especialmente a função dos miRNA no próprio oócito ainda é questão de debate. Nocautes de Dicer específicos para células germinativas exibem anormalidades graves na formação do fuso e na organização cromossômica (Murchison et al., 2007). No entanto, a Dicer é usada não apenas para o processamento de miRNA, mas também para outras classes de pequenas moléculas de RNA que interagem com mRNAs como siRNA e piwiRNAs. Suh et al. (2010) descobriram que uma perda funcional de DGCR8 em oócitos de camundongo não afetou a maturação dos oócitos e o desenvolvimento embrionário inicial, apesar do impacto significativo na biogênese de miRNA. Da mesma forma, a depleção de Drosha

ou DGCR8 em oócitos suínos não afeta sua taxa de maturação (Liu et al., 2017). Esses dados podem indicar que miRNAs de oócitos podem não desempenhar um papel significativo na maturação do mesmo e no desenvolvimento embrionário inicial e que estas células dependem, em vez disso, da modificação pós-transcricionais mediada por siRNA do mRNA.

Muitas evidências foram acumuladas nos últimos anos sobre a expressão diferencial de vários miRNAs durante o crescimento do oócito, maturação ou envelhecimento. Além disso, Tesfaye et al., (2017; 2018) mostraram que a inibição ou nocaute de miRNAs específicos nos oócitos alterou em sua taxa de maturação e capacidade de desenvolvimento reforçando seu papel no desenvolvimento e maturação dos oócitos.

2.5. Papel dos miRNAs extracelulares na regulação da fertilidade nas fêmeas

Acreditava-se que miRNAs estariam localizados apenas dentro das células, por possuírem sensibilidade a diferentes RNases. No entanto, foi detectada uma série de miRNAs em quase todos os fluídos biológicos. Pela detecção de miRNA em vesículas extracelulares, especialmente exossomos e microvesículas, que além de protegerem os miRNAs, também permitem o seu transporte pelos tecidos e órgãos, foi possível desvendar o enigma relacionado a presença de miRNAs em fluídos (Valadi et al., 2007). Sohel et al., 2013 demonstraram que miRNAs extracelulares podem ser liberados dos exossomos e afetam a expressão de mRNA nas células alvo.

Os miRNAs exossômicos presentes no fluido folicular, soro sanguíneo e meios de cultura, refletem condições fisiológicas e patológicas associadas a funções reprodutivas. Os padrões de expressão de miRNAs em vesículas extracelulares variam com o tamanho do folículo (Navakanitworakul et al., 2016), estágio do ciclo estral (da Silveira et al., 2014) ou da idade (Diez-Fraile et al., 2014; da Silveira et al., 2012). Em humanos, tem sido demonstrado que vários distúrbios reprodutivos graves e relativamente frequentes, como a síndrome do ovário policístico, insuficiência ovariana prematura ou endometriose são acompanhados de expressão alterada de miRNAs em vesículas extracelulares no soro sanguíneo (Tesfaye et al., 2017).

Evidências recentes sugerem que os exossomos são liberados no soro sanguíneo e no fluido folicular sob condições de estresse e seus conteúdos podem afetar a função das células da granulosa e do cumulus assim como o desenvolvimento

oocitário (Rodrigues et al., 2019; Gebremedhn et al., 2020). Vesículas extracelulares isoladas de fluido folicular de vacas sob estresse por calor mostraram o complexo cumulus-oócito *in vitro* com expressão modificada de genes relacionados com sinalização celular, sobrevivência e qualidade do oócito (Morales Dalanezi et al., 2019). É concebível que essas mudanças fossem, pelo menos em parte, causadas por miRNAs presentes nas vesículas extracelulares

2.6. Os miRNAs como marcadores da competência de desenvolvimento do oócito

A competência de desenvolvimento do oócito é definida como a capacidade do oócito maduro de sofrer fertilização, desenvolvimento embrionário, pré-implantação precoce, capacitando o desenvolvimento à termo. A identificação de um marcador não invasivo de qualidade do oócito e da competência de desenvolvimento do embrião é de grande importância para a seleção de CCOs para protocolos de maturação oocitária e PIV (produção de embriões *in vitro*). A detecção de EV/miRNAs é um método não invasivo em relação a oócitos e embriões, uma vez que as EVs podem ser isoladas de soro sanguíneo, fluido folicular e meios de cultura. Além disso, as EV/miRNAs são resistentes à altas temperaturas, pH alto e/ou baixo, armazenamento prolongado e ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, situações nas quais o mRNA celular é degradado rapidamente (Tsfaye et al., 2017).

Foi demonstrado que vários miRNAs com alto potencial de biomarcador são expressos diferencialmente em fluido folicular pequenos e grandes que carregam oócitos com diferentes potenciais de desenvolvimento (Sohel et al., 2013; Navakanitworakul et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que alguns miRNAs encapsulados em exossomos podem ser captados por GCs, alterando subsequentemente a expressão de miRNAs intracelulares correspondentes e seus genes alvo (Sohel et al., 2013). Isso sugere que os miRNAs de diferentes compartimentos foliculares podem afetar a função das células somáticas foliculares e, portanto, a maturação do oócito.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1. Justificativa

Baixos resultados na fertilização *in vitro* (FIV) podem ser atribuídos a dois principais fatores: as condições de cultivo *in vitro* (Russel et al., 2006) e a qualidade dos oócitos selecionados para a maturação *in vitro* (MIV) (Camargo et al., 2006). Durante a aspiração folicular (OPU) há grande heterogeneidade no diâmetro dos folículos aspirados, encontrando oócitos que ainda não possuem completa habilidade de desenvolvimento, afetando de forma importante os resultados da FIV (Mota, 2008).

Os folículos ovarianos que possuem oócitos com diferentes capacidades de maturação *in vitro* diferem no perfil de expressão de miRNAs intracelulares de células foliculares somáticas (células da granulosa e do cumulus) e extracelulares liberados no fluido folicular em vesículas extracelulares.

Sabendo que os miRNAs têm papel distinto na regulação do desenvolvimento oocitário, esse trabalho tem como hipótese:

- 1) os miRNAs bta-miR 138 e bta-miR 193a-5p estão envolvidos no desenvolvimento da competência oocitária.
- 2) os genes *BMP15*, *GDF9*, *NPPC*, *GJ1*, *GPR3* e *GJ4*, regulam o mecanismo de competência oocitária.

3.2. Objetivo geral

Identificar miRNAs e mRNAs de células da granulosa, cumulus, oócitos e fluido folicular que regulam o desenvolvimento da competência *in vitro* de oócitos, podendo ser usados como biomarcadores em reprodução assistida.

3.3. Objetivos específicos

1- Identificar diferenças nos padrões de expressão de mRNAs de células da granulosa, complexo cúmulus-oócito e fluido folicular em oócitos com alto (BCB+) e baixo grau de competência (BCB-).

2- Investigar as redes de interação entre os miRNAs e os mRNAs de células da granulosa, cumulus-oócito e fluido folicular na avaliação da qualidade dos oócitos aspirados *in vitro* (BCB+ e BCB-).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Ética

Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações da Legislação Brasileira, após apreciação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP nº 70/2022) e também da Embrapa Gado de Leite (Protocolo 9142040522) tendo seguido as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão regidas pela legislação nacional.

4.2. Local e Animais

Foram utilizadas quatro vacas púberes com idade entre 6 e 7 anos da raça Gir, que foram aspiradas semanalmente entre os meses de Maio e Dezembro de 2022, até se obter 6 oócitos, de cada animal, acompanhados de células do cumulus, células da granulosa e fluído folicular e sem a presença de sangue. O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite localizado no município de Coronel Pacheco - MG, onde os animais permaneceram a pasto, suplementadas com sal mineral e água *ad libitum*. A avaliação morfológica das estruturas era feita imediatamente após as coletas no Laboratório de Cultivo de Embriões no Complexo Multiusuário do Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite. As avaliações bioquímicas e moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV.

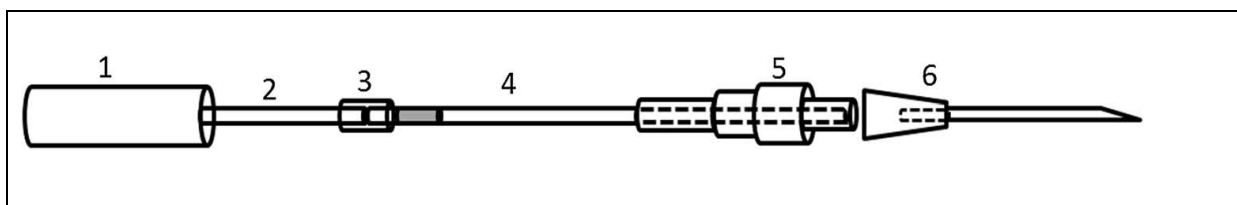
4.3. Aspiração Folicular (*Ovum pick-up* - OPU) adaptado

As novilhas foram sincronizadas, utilizando protocolo o seguinte protocolo: no dia zero os animais receberam 2mL de benzoato de estradiol (Ric Be, 1 mg/mL; Agener, São Paulo, Brasil), 2mL de cloprostenol, análogo da PGF2 α (Estron, 0,250mg/mL; Agener) e foi inserido um dispositivo intravaginal de P4 (Primer, 1,0g P4; Agener). No dia oito, foi feita a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, aplicação de 2mL de cloprostenol, análogo da PGF2 α (Estron, 0,250mg/mL; Agener) e 1mL de cipionato de estradiol (Cipiotec, 1mg/mL; Agener).

As aspirações começaram seis dias após a confirmação da ovulação (dia 10). Os folículos antrais (4 - 8 mm) foram aspirados individualmente, através de um sistema OPU adaptado (Figura 1). Esse sistema foi usado por Arashiro et al.; (2013), adaptando uma palheta de sêmen de 0,25 mL entre o circuito Teflon e a agulha de aspiração (20g), fazendo com que o fluido folicular de cada folículo individualmente vá diretamente para a palheta sem passar pelo circuito. A pressão do vácuo utilizada foi de 120 mm/hg.

Após o colapso do folículo, a agulha era removida do ovário imediatamente, e a palheta era verificada quanto a presença de fluido folicular; caso houvesse a presença visível de sangue o aspirado era descartado. A cada nova aspiração folicular o sistema era trocado para evitar contaminação cruzada dos materiais bioquímicos e moleculares de cada folículo.

Figura 1 - Ilustração do Sistema OPU adaptado. Uma palheta de sêmen de 0,25 mL (4) foi colocada entre o circuito Teflon (2) e a agulha (6). Para conectar o canudo, um pequeno tubo de silicone foi utilizado para prender uma ponta ao circuito, enquanto a outra ponta foi conectada diretamente à agulha (6). 1- Guia de agulha; 2- Circuito de Teflon; 3- Tubo de silicone; 4- Palheta de sêmen 0,25ml; 5- adaptador de agulha; 6- Agulha 20G.



Fonte: Adaptado de Arashiro et al.; 2013.

4.4. Classificação e Separação do Complexo Cúmulus-Oócito

Imediatamente após cada folículo ser aspirado, a palheta era levada ao Laboratório de Cultivo de Embriões, onde o líquido presente na palheta era depositado em placa de petri e levado ao estereomicroscópio para inspeção da presença ou ausência do CCO. Se presente, o CCO era identificado e classificado de acordo com a sua morfologia, em grau I, II, III e IV, seguindo a classificação utilizada por Viana et al.; (2004) com adaptações:

- Grau I: CCO compacto, mais de três camadas de células do cumulus e oócito com citoplasma homogêneo.
- Grau II: CCOs compactos com três ou menos camadas de células do cumulus, ou oócito com citoplasma levemente heterogêneo.
- Grau III: Parcialmente desnudados, oócitos mostrando remoção de células do cumulus de menos de 1/3 da superfície da zona pelúcida.
- Grau IV: Desnudados e/ou degenerados, oócitos sem células do cumulus na maior parte da superfície da zona pelúcida e/ou vacuolização e encolhimento do citoplasma.

Após seleção e classificação, os CCOs eram lavados três vezes em PBS. Para o trabalho somente os CCOs classificados em grau I e II foram utilizados.

4.5. Coloração do CCO com Azul Cresil Brilhante (BCB)

Imediatamente após a classificação morfológica dos CCOs, aqueles classificados por grau I e II, eram transferidos individualmente para outra placa de petri com identificação do animal, classificação do oócito e a hora em que a transferência para a nova placa foi feita.

Junto ao CCO era adicionado 20 μ L de Azul Cresil Brilhante (BCB) diluído em PBS na concentração de 26 μ M, e levado à estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, e temperatura de 38°C, por 60 min (Queiroz Neta, L.B. et al. 2019). Posterior ao término do tempo de exposição do CCO ao corante, ele era novamente avaliado e classificado de acordo com a coloração do seu citoplasma. Aqueles que apresentaram o citoplasma corado de azul, foram classificados em BCB+, para aqueles que apresentaram citoplasma incolor, foram classificados como BCB-. Cada CCO era então transferido individualmente para um criotubo com 20 μ l de PBS, identificado com o número do animal, a classificação morfológica do CCO, e a classificação quanto ao BCB. Cada criotubo foi armazenado em botijões de nitrogênio líquido.

4.6. Recuperação das células da granulosa e do fluido folicular

Concomitante com o teste de coloração de BCB, a separação do fluído folicular e das células da granulosa era feita, separando-os do CCO, após sua classificação e retirada para o teste BCB.

Após a retirada do CCO, o fluído folicular era transferido para um microtubo e levado para centrífuga 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante (fluído folicular) foi colocado em um criotubo, e o pelete formado (células da granulosa) foi acrescido de 20 µl de PBS e transferido para outro criotubo. Os dois criotubos foram identificados com o número do animal, as informações do CCO, e armazenados em nitrogênio líquido.

4.7. Extração de RNA total

As amostras de cada vaca foram reunidas em pool BCB+ e BCB- , cada um incluindo 3 CCO e seus respectivos fluidos foliculares e GCs, totalizando 1 pool BCB+ e 1 pool BCB- por vaca. A extração foi realizada utilizando TRIzol® reagente (Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente os pools BCB+ ou BCB- correspondentes a cada vaca foram descongelados em gelo, para a extração. Ao conteúdo adicionava-se 500 µL de TRIZOL, seguido de homogeneização em vórtex. Posteriormente era adicionado 250 µL de clorofórmio e novamente homogeneizado no vórtex. A solução ficava então 5 min em gelo até ser levada para a centrífuga por 15 min a 12000 x g a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e então adicionado 1,5 vezes o volume da solução de isopropanol. Novamente a solução era centrifugada por 10 min a 12000 x g a temperatura de 4°C. Após a centrifugação a presença de pelete era observada e o sobrenadante descartado. Adicionava-se então 1000 µL de etanol 70%, e novamente centrifugava-se por 5 min a 12000 x g a temperatura de 4°C. O sobrenadante era descartado e ao final o RNA total extraído era ressuspendido em 20 µL de H₂O ultrapura.

4.9. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada usando o kit mirScript RT II, utilizando o 5x miScript Hiflex Buffer, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, EUA). Em seguida, o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso na Reação em Cadeia da

Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) tanto para avaliação da expressão de miRNA quanto para mRNA. Após a síntese de cDNA, as concentrações foram estimadas pelo equipamento espectrofotômetro NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™, EUA). Os resultados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantificação de cDNA(ng/uL) por amostra.

ANIMAIS	7309		7304		7318		7317	
AMOSTRAS	BCB+	BCB-	BCB+	BCB-	BCB+	BCB-	BCB+	BCB-
cDNA (ng/uL)	626	461,6	620,4	444,03	266,8	521,9	515,6	509,1

Fonte: ARAÚJO.,(2023)

4.10 Seleção de alvos para análise de expressão gênica

Genes relacionados ao processo biológico de competência oocitária foram escolhidos por meio da revisão apresentada por Strączyńska *et al.*, (2022). Então, devido a seus papéis relevantes nos processos de maturação do oócito e regulação da fertilidade feminina, os seguintes genes foram selecionados para ter sua expressão investigada neste estudo: *BMP15*, *NPPC*, *GPR3*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* (Quadro 1). Além disso, miRNAs envolvidos nos processos biológicos e suas possíveis interações com os genes alvo deste estudo foram investigados e selecionados utilizando o *software* TargetScan (www.targetscan.org). Somente os miRNAs com maiores *scores* de correlação com os genes alvos foram escolhidos, entre eles: bta-miR 138 (gene *NPPC*) e bta-miR 193a-5p (gene *GPR3*). Os genes alvo, os miRNAs, suas funções e interações são demonstrados no Quadro 1.

As sequências de nucleotídeos para os genes alvo e um controle endógeno (RNA *18S*) foram obtidos no banco de dados NCBI (Betesda, EUA). Em seguida essas sequências de nucleotídeos foram utilizadas para desenho de *primers* usando o *software* PrimerQuest da IDT (Owczarzy *et al.*, 2008). A sequência de primers para os miRNA são as próprias sequências complementares (primer forward) do miRNA obtidas do TargetScan além de uma sequência reverse universal fornecida no kit miScrip SYBR® Green PCR (Qiagen, EUA).

Quadro 1: Lista de genes analisados por qPCR.

Gene#	Molécula*	Função	Componente celular
<i>BMP15</i>	mRNA	Regulador da fertilidade	Células da Granulosa/Extracelular
<i>GDF9</i>	mRNA	Regulador da fertilidade	Células da Granulosa/Extracelular
<i>NPPC (CNP)</i>	mRNA + miRNA (bta-miR 138)	Inibidor da maturação oocitária	Células da Granulosa/Extracelular
<i>GPR3</i>	mRNA + miRNA (bta-miR 193a-5p)	Mantem a parada meiotica	Oócito
<i>GJ1 (CX43)</i>	mRNA	Junção Theca-Granulosa	Núcleo/mitocôndria/membrana plasmática
<i>GJ4 (CX 37)</i>	mRNA	Junção Granulosa-Oócito	Membrana plasmática

BMP15, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4*: não apresentaram miRNAs conservados no programa TARGETSCAN.

* miRNAs selecionados na opção “Converved” do programa TARGETSCAN VERSÃO 80, atualizado em setembro 2021 para a espécie “COW”.

Fonte: ARAÚJO.,(2023)

Todos os primers usados nas PCRs quantitativas para os transcritos gênicos passaram pelo teste de eficiência, avaliando a melhor concentração de primers e de cDNA para sua utilização (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Sequência de *primers*, número de acesso no NCBI para as sequências utilizadas e valores dos testes de eficiência para cada um dos transcritos analisados neste estudo.

Gene	Número de acesso NCBI	Sequência	Teste de eficiência
<i>BMP15</i>	NM_001031752.1	F: CTGGATCATCGCTCCCCATC R: GGACACTCTGATCCACCAGC	110%
<i>GDF9</i>	NM_174681.2	F:TCGGACATCGGTATGGCTCT R:ACACAGGATGGTCTTGGCAC	98%
<i>NPPC</i>	NM_174125.2	F: CTGCGTTTTGCTGAGGTCAC R: AAAAGCCACATTGCGCTGG	100%
<i>GPR3</i>	XM_005203298.4	F: GTCCAGCACCATAGCCAGAG R: AGGAATAGGGGACTGGGGAC	116%
<i>GJ1</i>	NM_174068.2	F: GCAGGCAGCACCATCTCTAA R: CACAATGGCGAGAGGCTGTA	118%
<i>GJ4</i>	NM_001083738.1	F: CCACACTTTGCCCTCCAGAA R:GGCTCAAACACCCTTGGCTA	113%
RNA18S	NR_036642.1	F: CCAGTAAGTGCGGGTCATAA R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG	97%

F: *Foward primer*, R: *Reverse primer*, *BMP15* - proteínas morfogenética óssea 15, *GDF9* - fator de diferenciação de crescimento 9, *NPPC* - precursor do peptídeo natriurético tipo C, *GPR3* - receptor acoplado à proteína G, *GJ1* - Connexina 43, *GJ4* – Connexina 37).

Fonte: ARAÚJO.,(2023)

Tabela 3 - Sequência de *primers*, número de acesso no NCBI ou no MIRBASE para cada um dos miRNAs analisados neste estudo

miRNA	Acesso	Sequência	Gene Alvo
Bta-miR-138	MI0005029 MiRBASE	5'-TCGACCACAACACTTAGTCCGGC-3'	NPPC
Bta-miR-193a-5p	MI0005014 MiRBASE	5'-ACCCAGAAACGCCCGCTCTACT-3'	GPR3
U6*	XR_003033653 NCBI	5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCAC-3'	

NPPC - precursor do peptídeo natriurético tipo C, *GPR3* - receptor acoplado à proteína G, U6 – controle endógeno

Fonte: ARAÚJO.,(2023)

4.11. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A qPCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativa para os transcritos dos genes alvo foi realizada no termociclador CFX96 (BioRad Laboratories, EUA), utilizando o kit Gotaq qPCR Master Mix (Promega, EUA), conforme recomendações do fabricante. As condições de amplificação para as reações com os transcritos *BMP15*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* e o controle endógeno RNA 18S, foram: 95°C durante 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C de 15 s cada, anelamento e extensão a 60°C durante 60 s. Após 40 ciclos de amplificação, a curva de dissociação foi obtida pela etapa adicional com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C (0,01-C/s) para avaliação da especificidade da reação. As condições de amplificação para a reação com os transcritos *NPPC*, *GPR3*, precisaram ser modificadas, pois as curvas de dissociação na temperatura de anelamento de 60°C apresentavam mais de um pico. Portanto para esses transcritos as amplificações foram feitas como segue: 95°C durante 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C de 15 s cada, anelamento e extensão a 64°C durante 60 s. Após 40 ciclos de amplificação, a curva de dissociação foi obtida para todos os transcritos, pela etapa adicional com elevação gradual da temperatura de 64°C a 94°C (0,01-C/s) para avaliação da especificidade da reação. Para a amplificação do controle endógeno seguiu-se os mesmos padrões que os alvos, o gene 18S foi também amplificado na temperatura de 64°C.

Amplificação dos genes alvo e do gene de referência endógeno foram realizados em diferentes poços na mesma placa de qPCR. Todas as reações para o mesmo gene alvo e tratamento foram feitas com réplicas técnicas. Os dados quantitativos de qPCR

em tempo real foram obtidos como valores de Ct, usados posteriormente na análise estatística.

Para análise da expressão dos miRNAs (bta-miR138, bta-miR 193a-5p e o endógeno U6) foi utilizado o kit miScrip SYBR® Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. As condições de amplificação para a reação foram: 95°C durante 15 min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C de 15 s cada, anelamento a 55°C por 25 s e extensão a 70°C por 30 s.

4.12. ANÁLISE DE DADOS

Os dados de Ct (Threshold Cycles, Ciclos limiares) obtidos foram analisados utilizando o método comparativo do Δ CT e os níveis de expressão gênica acessados através dos valores $2^{(-\Delta Ct)}$ (Livak e Schotten, 2001). Test- *t* foi utilizado para comparar as médias de cada tratamento (oócitos BCB+ e oócitos BCB-) para cada transcrito e miRNA. Os resultados foram considerados significativos quando atingido o valor de $\alpha = 0,05$ e $P = +/- 4,31$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o crescimento e o desenvolvimento do oócito, ele adquire reservas maternas (mRNAs e proteínas) essenciais para o desenvolvimento do embrião nos estágios iniciais. Neste sentido, oócitos em crescimento não possuem completa habilidade de desenvolvimento (Mota, 2008). Investigou-se então miRNAs e mRNAs de células da granulosa, cumulus, oócitos e fluido folicular, que regulam o desenvolvimento da competência *in vitro* de oócitos em novilhas da raça Gir. Por meio da técnica de qPCR, os genes alvo *NPPC*, *BMP15*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* e *GPR3* e os miRNAs bta-miR138 e bta-miR193a-5p foram investigados quanto ao seu nível de expressão em folículos aspirados individualmente e classificados quanto a sua competência pelo teste BCB.

5.1. Expressão Gênica dos Genes Alvo

Os resultados da expressão dos genes alvo *NPPC*, *BMP15*, *GDF9*, *GJ1*, *GJ4* e *GJR3* não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos BCB+ e BCB-

(Tabela 4). Duas possibilidades podem ser levantadas para a falta de significância dos resultados: 1) a fase do ciclo estral em que os animais tiveram seus folículos ovarianos aspirados não mostra diferença na expressão dos genes estudados, apesar de envolvidos na retomada da meiose, discordando do que descreve Strączyńska *et al.*, (2022). 2) Apesar da via gênica que leva à competência oocitária estar ativada em ambos os grupos, outras vias gênicas estariam envolvidas na diferença de perfil da competência oocitária, originando assim os fenótipos BCB+ e BCB-. Analisando-se a função de cada um dos genes alvo estudados no presente estudo, pode-se discutir o papel de cada um deles no fenótipo aqui analisado, como também inferir sobre quais outras vias gênicas que estariam relacionadas com o perfil dos oócitos BCB+ e BCB-.

Outro fato que pode ter contribuído para que os resultados não fossem estatisticamente significativos, foi a grande variação entre as amostras dentro de um mesmo gene. Por meio do desvio padrão e do coeficiente de variação pode-se observar que houve grande variação entre as amostras de um mesmo gene, possivelmente relacionado a variação individual das reservas ovarianas entre os animais.

Tabela 4 - Expressão relativa média e o erro padrão em unidades arbitrárias ($2^{-(\Delta ct)}$) dos transcritos para os tratamentos BCB+ e BCB- .

Gene [¥]	$\bar{X} \pm$ Erro Padrão BCB+	$\bar{X} \pm$ Erro Padrão BCB-	CV	Test T*
<i>NPPC</i>	0,0031±0,0424	0,0220±0,0055	7,6931	0,4618
<i>BMP15</i>	0,0325±0,0080	0,0413±0,0095	7,3447	-0,0148
<i>GDF9</i>	0,0259±0,0063	0,0453±0,0128	6,0786	-0,0322
<i>GJ1</i>	0,01±0,0061	0,0057±0,0023	7,6564	0,0641
<i>GJ4</i>	0,00±0,0008	0,0036±0,0010	6,9069	-0,0047
<i>GPR3</i>	0,0638±0,0440	0,0088±0,0032	9,7915	0,3577

*Valor de significância para duas amostras na comparação de média do teste T Student ($\alpha= 4,31$).[¥]
NPPC - precursor do peptídeo natriurético tipo C; *BMP15* - proteína morfogenética óssea 15; *GDF9* - fatores de diferenciação de crescimento 9; *GPR3* - receptores acoplados à proteína G; *GJ1* - Conexina 43; *GJ4* – Conexina 37.

Fonte: ARAÚJO.,(2023)

O gene *NPPC* não apresentou diferença estatística na expressão para os tratamentos BCB+ e BCB-. A falta de diferença pode estar relacionada com a fase do ciclo estral em que os animais foram aspirados. De acordo com Jankowskie et al., 1997, o gene é modulado conforme a fase do ciclo estral em camundongos.

Os resultados referentes aos tipos de folículos quando a sinalização *NPPC/NPR2*, são conflitantes. Enquanto Zhang et al., 2010 relatam mudanças nos tipos e na quantidade de folículos em camundongos com *knouckout* de *NPR2*, Tamura et al., 2004 demonstram a presença somente de estágios primordiais, primários e secundários. Em contraste, Kiyosu et al. (2012) demonstraram que para camundongos mutantes na cascata *NPPC/NPR2*, existiram todos os tipos de folículos. Possivelmente, essas diferenças ocorrem pela diferença de métodos utilizados para mutação sitio dirigida, que poderia levar, em alguns casos, a continuação da síntese de cGMP, permitindo a sobrevivência e o desenvolvimento de novos folículos. Outro fator que poderia explicar essas diferenças nos tipos de folículos é a diferença individual nas reservas ovarianas dos animais mutantes (Onder Celik et al., 2019).

Para os genes *BMP15* e *GDF9* também não houve diferença estatística entre os tratamentos BCB+ e BCB-. Os dois genes estão relacionados com a fertilidade e possuem alto grau de homologia de aminoácidos e estrutura proteica semelhante (Safins A. et al., 2018). A produção de fêmeas *knouckout* de camundongos para *GDF9* não apresentaram folículos de Graaf, não exibindo folículos além dos folículos primários; não houve também, a diferenciação dos compartimentos foliculares. Nos folículos primordiais a competência meiótica ocorreu de forma normal. Na ausência de *GDF9* a foliculogênese não evoluiu além dos estágios primários (Hennet et al., 2012, Mazerbourg et al., 2006, Franzen et al., 1993). Em contrapartida, o *knouckout* de *BMP15* em camundongos não provocou grandes alterações no desenvolvimento folicular. Entretanto, foram identificados defeitos no processo de ovulação e na expansão do cúmulus, afetando a fertilização e a fertilidade (Yan et al., 2000, Gueripel et al., 2006). Hosoe et al., (2011), demonstraram que a intensidade de expressão de transcritos *GDF9* e *BMP15* diferiram em oócitos e células do cumulus de novilhas e vacas adultas, sugerindo que a expressão imatura de *GDF9* e *BMP15* no ambiente intrafolicular, está associada à menor competência de desenvolvimento dos oócitos nas novilhas. Com base nesses resultados, é possível entender a importância dos genes durante a foliculogênese, entretanto considerando o resultado do presente

trabalho para estes genes, não houve diferenças significativas para a competência oocitária.

Para o gene GJ1 (Cx43), as expressões não apresentaram diferença significativa entre BCB+ e BCB-. O mesmo resultado foi observado para GJ4 (Cx37). Camundongos knockout para o gene GJ1, que codifica a proteína Cx43, mostraram que a sua falta interrompe o crescimento do folículo durante os estágios iniciais e bloqueia a meiose (Ackert et al., 2001) (Norris et al., 2008). A deleção sitio dirigida do gene GJ4, que codifica a proteína Cx37 em camundongos, resulta na presença de cromatina condensada, típica do estágio de vesícula germinativa e conseqüentemente há incapacidade de retomar a meiose (Carabatsos et al., 2000).

Contrapondo esses resultados, nosso trabalho demonstrou que esses genes apesar de importantes durante o processo de competência oocitária, não garantem que o oócito se tornará competente, visto que eles foram expressos sem diferença significativa tanto em oócitos BCB- quanto em oócitos BCB+.

O gene *GPR3*, não teve sua expressão com diferenças significativas entre BCB+ e BCB-. Apesar de ser um gene que controla a retomada da meiose, outros genes e mecanismos atuam neste processo influenciando a aquisição da competência oocitária, isso justificaria sua expressão em oócitos BCB-. Os dados obtidos por Zhang et al., (2012) em suínos, indicam que o gene *GPR3* é membro da família de receptores acoplados a proteína G da rodopsina, e demonstra seu papel fundamental na prevenção da retomada prematura da meiose em folículos antrais (Mehlmann et al., 2004). Em humanos, *GPR3* demonstrou manter a concentração de cAMP em um nível que garante a parada meiótica na prófase I, até o momento em que o hormônio luteinizante aumenta sua concentração e desencadeia a retomada meiótica (DiLuigi et al., 2008). Vaccari et al., (2008) observou comportamento semelhante em camundongos para o gene *GPR3*, assegurando a concentração de cAMP e garantindo a parada meiótica na prófase I. Camundongos *knockout* *GPR3*, são incapazes de manter as concentrações de cAMP no oócito, levando a retomada precoce da meiose, independente de gonadotropinas, interrompendo o processo de maturação (Ledent et al., 2005).

5.2. Expressão dos miRNAs

Os resultados da expressão dos miRNAs demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos BCB+ e BCB-.

Tabela 5 - Expressão relativa média e o erro padrão em unidades arbitrárias ($2^{-(\Delta ct)}$) dos miRNAs para amostras BCB + e BCB -.

Transcrito	$\bar{X} \pm$ Erro Padrão BCB+	$\bar{X} \pm$ Erro Padrão BCB-	CV	Test T*
BTA- MIR 138	29,14 \pm 7,07 ^a	99,40 \pm 58,41 ^b	5,7175	-12,27
BTA-miR 193a-5P	60,88 \pm 22,78 ^a	89,81 \pm 31,02 ^b	13,0209	-5,57

*Valor de significância para os dois tratamentos na comparação de média do teste T student ($\alpha=0,05$, $P= 4,31$). Letras sobreescritas diferentes na mesma linha significam médias diferentes pelo teste T.

A expressão do bta-miR138 e bta-miR193a-5p apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos BCB+ e BCB-. Para os dois miRNAs, a maior expressão foi no tratamento BCB-.

Foi observado que o miR-193 pode restringir a proliferação e a regulação do ciclo celular em células hepáticas não cancerosas (Grossi, et al., 2017). O miR-138, de acordo com Chunlin et al., (2022) pode promover apoptose em células da granulosa de frangos. De acordo com as funções já descritas desses miRNAs, é possível relacionar nosso resultado, onde houve aumento de expressão no tratamento BCB-, pois os autores relatam o aumento da apoptose das células do cumulus e da granulosa, responsáveis por nutrir o oócito e influenciar a competência oocitária. Não foi observado variação na expressão dos genes alvo para os miRNAs. Os efeitos destes miRNAs na tradução dos transcritos por eles regulados não foi acessada neste trabalho, dada a pequena quantidade de material biológico que se extrai de cada folículo. Entretanto, estes miRNAs passam a ser marcadores não invasivos no diagnóstico de competência oocitária, auxiliando técnicos a selecionar quais os oócitos poderão, ou não, ser utilizados nos protocolos Produção de embriões in vitro. Devido a escassos trabalhos observando os efeitos dos miRNAs na reprodução, é possível inferir que existem outros genes sejam regulados pelos miRNAs aqui descritos, evidenciando a necessidade de mais pesquisas para entender as possíveis vias gênicas em que estão envolvidos.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados não suportaram a nossa hipótese inicial de que os genes alvo *NPPC*, *GDF9*, *BMP15*, *GPR3*, *GJ1* e *GJ4* estariam associados à competência oocitária. Apesar dos genes estudados estarem envolvidos em uma via gênica que atua no desenvolvimento da competência oocitária, os achados dos tratamentos BCB+ e BCB- não apresentaram diferenças significativas, demonstrando que outras vias gênicas estariam envolvidas nesse processo, e precisam ser avaliadas para a total compreensão da aquisição da competência.

Quanto aos miRNAs foi possível observar a relação de ambos, bta-miR 138 e bta-miR 193a-5p no desenvolvimento da competência oocitária. Possivelmente atuando na regulação do desenvolvimento e proliferação nas células do cumulus e da granulosa, interferindo negativamente no mecanismo da competência oocitária. Para compreender melhor o mecanismo de atuação do mir-138 e mir-193 na competência oocitária e os genes envolvidos há necessidade de pesquisar novas redes gênicas que envolvem estes miRNAs.

REFERÊNCIAS

- ACKERT, Cheryl L. et al. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental biology**, v. 233, n. 2, p. 258-270, 2001.
- AGUILA, Luis et al. Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2196, 2020.
- ALM, H. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2194-2205, 2005.
- AMBROS, Victor. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.
- ANDERSON, Everett; ALBERTINI, David F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **The Journal of cell biology**, v. 71, n. 2, p. 680-686, 1976.
- ANGUITA, Begoña et al. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 526-536, 2007.
- BENSON, D. A. et al. GenBank Nucleic Acids Res. **jan**, v. 1, p. 33, 2005.
- CAMARGO, LS d A. et al. Factors influencing in vitro embryo production. 2006.
- CARABATSOS, Mary Jo et al. Oocyte–granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Developmental biology**, v. 226, n. 2, p. 167-179, 2000.
- CELIK, Onder et al. Nppc/Npr2/cGMP signaling cascade maintains oocyte developmental capacity. **Cellular and Molecular Biology**, v. 65, n. 4, p. 83-89, 2019.
- CHANG, Hsun-Ming; QIAO, Jie; LEUNG, Peter CK. Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. **Human reproduction update**, v. 23, n. 1, p. 1-18, 2017.
- CHANG, Hua; BROWN, Chester W.; MATZUK, Martin M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 6, p. 787-823, 2002.
- COMBELLES, Catherine MH et al. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10-11-12, p. 819-831, 2013.
- CONTI, Marco; FRANCIOSI, Federica. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. **Human reproduction update**, v. 24, n. 3, p. 245-266, 2018.

COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos in vitro**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 155p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais.

DALANEZI, Felipe Morales et al. Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. **Animal reproduction science**, v. 205, p. 94-104, 2019.

DA SILVEIRA, Juliano C. et al. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. **Journal of Endocrinology**, v. 236, n. 1, p. R15-R27, 2018.

DE QUEIROZ NETA, Luiza Bento et al. Otimização do ensaio de azul cresil brilhante visando à seleção qualitativa de oócitos bovinos derivados de ovários submetidos a diferentes temperaturas e tempos de transporte. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 4, n. 1, p. 5-9, 2019.

DENNIS, Glynn et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. **Genome biology**, v. 4, n. 9, p. 1-11, 2003.

DIAZ, F. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. **Developmental biology**, v. 305, n. 1, p. 300-311, 2007.

DIEZ-FRAILE, Araceli et al. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization. **Human fertility**, v. 17, n. 2, p. 90-98, 2014.

DILUIGI, Andrea et al. Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 4, p. 667-672, 2008.

DINIZ, E. G.; ESPER, C. R.; JACOMINI, J. O.; VIEIRA, R. C.; Morphological Development of the ovaries in embryos and fetuses of Nelore breed. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.70-76, 2005.

DZAFIC, Edo et al. Expression of mesenchymal stem cells-related genes and plasticity of aspirated follicular cells obtained from infertile women. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

EGGERICKX, Dominique et al. Molecular cloning of an orphan G-protein-coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase. **Biochemical journal**, v. 309, n. 3, p. 837-843, 1995.

Eppig JJ, Viveiros C, Marin-Bivens R, De La Fuente. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung PCK, Adashi EY, editors. *The Ovary*. 2nd ed. San Diego: Elsevier/Academic; 2004. p. 113–29.

EPPIG, John J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

FAKRUZZAMAN, Md et al. Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining. **Animal reproduction science**, v. 142, n. 1-2, p. 19-27, 2013.

FRANZEN, Petra et al. Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 681-692, 1993.

GEBREMEDHN, Samuel et al. Extracellular vesicles shuttle protective messages against heat stress in bovine granulosa cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2020.

GILCHRIST, Robert B.; THOMPSON, Jeremy G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, 2007.

GRIFFIN, Jeanine et al. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). **Journal of experimental & clinical assisted reproduction**, v. 3, p. 1-9, 2006.

GUÉRIPEL, Xavier; BRUN, Véronique; GOUGEON, Alain. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 6, p. 836-843, 2006.

GONÇALVES, P. B. D; BARRETA, M. H; SANDRI, L. R; FERREIRA, R; ANTONIAZZI, A. Q. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v. 31, n° 2, p.212-217, 2007.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v.33, p.82-84, 2009.

GROSSI, Ilaria et al. Clinical and biological significance of miR-23b and miR-193a in human hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 6955, 2017.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, p.523, 2004.

HASHIMOTO, Osamu; MOORE, R. Kelly; SHIMASAKI, Shunichi. Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 15, p. 5426-5431, 2005.

HOANG, Son Nghia et al. Evaluation of stemness marker expression in bovine ovarian granulosa cells. **Animal Reproduction**, v. 16, p. 277-281, 2019.

HOSOE, Misa et al. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 1-8, 2011.

HUANG, Da Wei; SHERMAN, Brad T.; LEMPICKI, Richard A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

INCERTI, Barbara et al. Structure of the mouse growth/differentiation factor 9 gene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1222, n. 1, p. 125-128, 1994.

JAFFE, Laurinda A.; EGBERT, Jeremy R. Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 237-260, 2017.

JANKOWSKI, Marek et al. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 1, p. 59-66, 1997.

KAIMAL, Vivek et al. ToppCluster: a multiple gene list feature analyzer for comparative enrichment clustering and network-based dissection of biological systems. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_2, p. W96-W102, 2010.

KIDDER, Gerald M.; MHAWI, Abdul Amir. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 123, n. 5, p. 613-620, 2002.

KIYOSU, Chiyo et al. NPPC/NPR2 signaling is essential for oocyte meiotic arrest and cumulus oophorus formation during follicular development in the mouse ovary. **Reproduction**, v. 144, n. 2, p. 187, 2012.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of animal science**, v. 82, n. suppl_13, p. E14-E23, 2004.

KOSSOWSKA-TOMASZCZUK, Katarzyna; DE GEYTER, Christian. Cells with stem cell characteristics in somatic compartments of the ovary. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

KRANC, W. et al. Molecular basis of growth, proliferation, and differentiation of mammalian follicular granulosa cells. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2017.

LEDENT, Catherine et al. Premature ovarian aging in mice deficient for Gpr3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 25, p. 8922-8926, 2005.

LEHNINGER, Albert L. et al. Principípios de bioquímica. In: **Principios de bioquímica**. 1995. p. 839-839.

LEVESQUE, J. T.; SIRARD, M. A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, n. 2, p. 133-139, 1994.

LI, Ying et al. MicroRNAs in ovarian function and disorders. **Journal of ovarian research**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2015.

LIU, Hung-Ching et al. Dicer is a key player in oocyte maturation. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 27, p. 571-580, 2010.

LI, Tony Y. et al. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. **Journal of cell science**, v. 120, n. 23, p. 4117-4125, 2007.

LIU, Wanxin et al. Endo-siRNA deficiency results in oocyte maturation failure and apoptosis in porcine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 11, p. 2168-2174, 2017.

MAIORANO, A. M. et al. Filho, AEV; Dos Santos Goncalves Cyrillo, JN; Curi, RA; De Vasconcelos Silva, JA Assessing genetic architecture and signatures of selection of dual purpose Gir cattle populations using genomic information. **PLoS ONE**, v. 13, p. e0200694, 2018.

MATZUK, Martin M. et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2178-2180, 2002.

MAZERBOURG, Sabine; HSUEH, Aaron JW. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. **Human reproduction update**, v. 12, n. 4, p. 373-383, 2006.

MCGEE, Elizabeth et al. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 138, n. 6, p. 2417-2424, 1997.

MEHLMANN, Lisa M. et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. **Science**, v. 306, n. 5703, p. 1947-1950, 2004.

MEIRELLES, Flávio V. et al. Is the American zebu really *Bos indicus*?. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 543-546, 1999.

MEUER, Stefan; WITTEWER, Carl; NAKAGAWARA, Kan-Ichi (Ed.). **Rapid cycle real-time PCR: methods and applications**. Springer Science & Business Media, 2012.

MOTTERSHEAD, David G. et al. Cumulin, an oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- β family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 39, p. 24007-24020, 2015.

MORENO-MOYA, Juan Manuel; VILELLA, Felipe; SIMÓN, Carlos. MicroRNA: key gene expression regulators. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 6, p. 1516-1523, 2014.

MOTA, Gustavo Bruno. Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante. 2008.

MURCHISON, Elizabeth P. et al. Critical roles for Dicer in the female germline. **Genes & development**, v. 21, n. 6, p. 682-693, 2007.

NASCIMENTO, Carolina Cardoso Nagib et al. Can Bos indicus cattle breeds be discriminated by differences in the changes of their sweat gland traits across summer and winter seasons?. **Journal of Thermal Biology**, v. 86, p. 102443, 2019.

NAVAKANITWORAKUL, Raphatphorn et al. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

NORRIS, Rachael P. et al. 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. 2008.

OWCZARZY, Richard et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W163-W169, 2008.

PERSANI, Luca et al. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. **Human reproduction update**, v. 20, n. 6, p. 869-883, 2014.

POTTEN, Christopher S.; LOEFFLER, Markus. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. **Development**, v. 110, n. 4, p. 1001-1020, 1990.

PUJOL, Marc; LÓPEZ-BÉJAR, Manel; PARAMIO, Maria-Teresa. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 735-744, 2004.

RODRIGUES, Thais A. et al. Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 5, p. 888-897, 2019.

RUVOLO, G. et al. New molecular markers for the evaluation of gamete quality. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, p. 207-212, 2013.

SALILEW-WONDIM, Dessie et al. The role of micrornas in mammalian fertility: From gametogenesis to embryo implantation. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 585, 2020.

SALVIANO, M. B. et al. Bovine non-competent oocytes (BCB-) negatively impact the capacity of competent (BCB+) oocytes to undergo in vitro maturation, fertilisation and embryonic development. **Zygote**, v. 24, n. 2, p. 245-251, 2016.

SANFINS, Alexandra; RODRIGUES, Patrícia; ALBERTINI, David F. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 35, p. 1741-1750, 2018.

SHIMASAKI, Shunichi et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004.

SILVA, D. S. et al. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 250-255, 2013.

SINHA, Pritam Bala et al. MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation. **Journal of ovarian research**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2017.

SIMON, Alexander M.; CHEN, Hwudaurw; JACKSON, Charity L. Cx37 and Cx43 localize to zona pellucida in mouse ovarian follicles. **Cell communication & adhesion**, v. 13, n. 1-2, p. 61-77, 2006.

SIRARD, Marc-André et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

STRACZYŃSKA, Patrycja et al. Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 20, n. 1, p. 37, 2022.

SOHEL, Md Mahmudul Hasan et al. Exosomal and non-exosomal transport of extracellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78505, 2013.

STEEVES, T. E.; GARDNER, David K. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 54, n. 1, p. 92-101, 1999.

SZKLARCZYK, Damian et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic acids research**, p. gkw937, 2016.

SUH, Nayoung et al. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. **Current Biology**, v. 20, n. 3, p. 271-277, 2010.

SU, You-Qiang et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. 2008.

TAMURA, Naohisa et al. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive

organs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17300-17305, 2004.

TANAKA, Shigeru et al. Neural expression of G protein-coupled receptors GPR3 modulates survival of neurons under hypoxic conditions. **Neuroscience Research**, n. 68, p. e207, 2010.

TESFAYE, Dawit et al. Potential role of microRNAs in mammalian female fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 8-23, 2017.

TESFAYE, Dawit et al. MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development. **Reproduction**, v. 155, n. 3, p. R121-R135, 2018.

TSUTSUMI, Osamu et al. Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. **Molecular reproduction and development**, v. 33, n. 3, p. 333-337, 1992.

UHLENBROCK, Kirsten; GASSENHUBER, Hans; KOSTENIS, Evi. Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors. **Cellular signalling**, v. 14, n. 11, p. 941-953, 2002.

VACCARI, Sergio et al. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. **Developmental biology**, v. 316, n. 1, p. 124-134, 2008.

VALADI, Hadi et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007.

VASSILATIS, Demetrios K. et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4903-4908, 2003.

VEITCH, Gregory I. et al. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. **Journal of cell science**, v. 117, n. 13, p. 2699-2707, 2004.

VERCESI FILHO, A. E. et al. Selection of tropical Dairy Cattle-The Experience from the Brazilian Gyr and Guzerat. In: **Proceedings of the 9th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig**. 2010.

VIANA, João Henrique Moreira et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal reproduction science**, v. 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

VIZONÁ, Rafael Guimarães et al. Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir cattle. **Theriogenology**, v. 148, p. 149-161, 2020.

ZHANG, Meijia et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 366-369, 2010.

ZHANG, Meijia et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4377-4385, 2011.

ZHANG, Baole et al. The porcine Gpr3 gene: molecular cloning, characterization and expression level in tissues and cumulus–oocyte complexes during in vitro maturation. **Molecular biology reports**, v. 39, p. 5831-5839, 2012.

WESS, Jürgen. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 5, p. 346-354, 1997.

YAN, Changning et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Molecular endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854-866, 2001.

YU, Chunlin et al. miR-138-5p promotes chicken granulosa cell apoptosis via targeting SIRT1. **Animal Biotechnology**, p. 1-10, 2022.