UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MAITE DEL COLLADO BARRONDO

Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária
e o desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* em bovinos

Pirassununga

2017

MAITE DEL COLLADO BARRONDO

Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária
e o desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* em bovinos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociência
Animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

del Collado Barrondo, Maite
dm232m Metabolismo lipídico e estresse celular durante a
maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário
in vivo e in vitro em bovinos / Maite del Collado
Barrondo ; orientador Felipe Perecin. --
Pirassununga, 2017.
224 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Metabolismo. 2. estresse celular. 3. complexo
cumulus-oócito. 4. produção in vivo e in vitro de
embriões bovinos. 5. miRNAs. I. Perecin, Felipe ,
orient. II. Título.

MAITE DEL COLLADO BARRONDO

Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária
e o desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* em bovinos

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Biociência
Animal

Data de aprovação: 21 / 07 / 17

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) FELIPE PERECIN

Instituição FZEA-USP Julgamento: APROVADA

Prof.(a) Dr.(a) MARULLA PERONA MILAGOTTO

Instituição UFABC Julgamento: aprovada

Prof.(a) Dr.(a) JOSÉ BURATINI JR

Instituição UNESP Julgamento: APROVADA

Prof.(a) Dr.(a) GENI ZACCAL MINOZZI

Instituição UNESP Julgamento: APROVADA

Prof.(a) Dr.(a) CLAUDIA LIMA VERDE LEAL

Instituição FZEA-USP Julgamento: aprovada

DEDICATORIA

Como no meu mestrado, como tudo na vida, dedico minha tese ao meu pai:

“Existe a pessoa, que além da vida, nunca deixou de me ensinar e indicar o caminho que devo seguir.

Pelo ensino infinito, dedicação e amor incondicional que sempre me demonstrou.

Dedico essa tese a quem jamais deixou de acreditar em mim, quem me proporcionou lembranças das quais tiro e tirarei forças para enfrentar qualquer obstáculo. Por me ensinar que lutar por um sonho é lutar pela vida.

Porque se existem anjos da guarda, ele é o meu.

Dedico esse trabalho ao meu sempre amado pai, Jose M^a del Collado.”

(DEL COLLADO, 2013)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à pessoa que possibilitou a realização desse doutorado, meu orientador, Prof. Dr. Felipe Perecin. Muito obrigada por acreditar em mim desde o primeiro dia desta jornada. Acredito que muitas vezes se superou no trabalho e mais do que orientador, foi mais um companheiro de laboratório, que lutou junto a mim e meus colegas para encontrar as respostas para todas nossas perguntas.

Agradeço quem junto ao Prof. Felipe Perecin, me orientou e ensinou. Ao Prof. Flávio Meirelles, Prof. Marcos Roberto Chiaratti, Juliano Coelho da Silveira, Juliano Rodrigues Sangalli e Rafael Villar Sampaio. É uma honra conviver com suas cabeças pensantes, sem duvida as mais maravilhosamente inteligentes que já conheci. Absorver um pouquinho de todo esse conhecimento é maravilhoso.

Junto a eles, meus companheiros de laboratório, pos-doutorandos, doutorandos, mestrando e imprescindíveis ICs. Muito obrigada ao Tiago Câmara de Bem, Gabriella Mamede Andrade, Ana Clara Mendes, Alessandra Bridi, Helena Saraiva, Rosane Mazzarella, Marina Lima, Antonio e Leticia Rabello Sousa. Obrigada por me ajudar a realizar esses experimentos, muitas vezes insanos.

Ao Professor Luciano Andrade Silva e seus orientados, em especial ao Marcelo e Bárbara, porque sem eles, nunca teria obtido as amostras necessárias para a realização dos experimentos deste doutorado.

A todos meus colegas do LMMD, que sempre me ajudaram e deram leveza ao meu doutorado: Martini, Laís Pessôa, Pedrinho, Katia Lancellotti Schwarz, Ramon Botigelli, Dani Paschoal, Hugo Fernandez, Gabriel Moreira (e a sua mulher Helô).

Tenho sorte de poder falar que meus companheiros de trabalho também são companheiros de churrascos, risadas e muita parceria.

Aos membros do Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSON da UNICAMP de Campinas por auxiliar nas análises de espectrometria. Em especial ao Prof. Marcos N. Eberlin, Rosy Simas, Adriana Godoy, Mirela Coelho e Lygia Marques.

À minha querida Bete, técnica do confocal da FMRP, por todo o ensinamento e paciência ao longo dos anos. Por me passar, há faz mais de 7 anos, toda essa paixão por microscopia.

Não posso deixar de agradecer aos que me ajudaram nas etapas anteriores da minha vida acadêmica até chegar aqui, meu orientador do mestrado, o Prof. Joaquim Mansano Garcia e minhas co-orientadoras, Prof. Flávia Lombardi Lopez e Dra. Naiara Zoccal Saraiva, que tiveram muita paciência em me ensinar desde o mais básico como realizar um experimento até os conhecimentos mais avançados. Em especial, agradeço à Naiara, a quem nunca poderei agradecer o suficiente por tudo o que fez por mim e minha carreira.

À minha “marida” Moana Rodrigues Franca, por toda essa vinhoterapia que tão bem nos faz.

Aos meus amigos de infância, especialmente à Ane e Jon Ander, que mesmo não entendendo o que faço, me apoiam.

Às minhas amigas Lary e Mury que até hoje me dão esse carinho que só quem tem uma amizade verdadeira conhece.

Não posso deixar de agradecer à que foi minha primeira família brasileira, a família da Lary: tia Elza e tio João e toda a família de Uberaba. Obrigada por me abrir as portas da sua casa e me fazer sentir parte dela.

À minha segunda família brasileira, aos meus sogros Sônia e Rogério Valsani, cunhados e sobrinha, Isabela. Obrigada por tudo, sempre me senti muito amada.

E por último, a minha família mais internacional, que como boa família só aumenta com os anos. Aos meus pais, Catalina Barrondo e José Maria del Collado, por me moldarem e terem me ensinado a ser quem sou, a minha força sempre saiu de vocês. Ao meu irmão, Jon del Collado, que sempre defendeu quem sou e me apoia incondicionalmente. Agradeço ter tido os melhores pais, que me ensinaram a lutar, sem economizar energia, pelo que você sonha. Mãe e Jon, obrigada por sempre pensar que eu sou capaz de fazer tudo o que eu achei impossível. Por nunca sem importar com o quão difícil é ter uma filha e irmã morando a 8000 km de distância e sempre me empurrar para frente. Ao meu namorado, Mateus Maldonado Carriero, e minha filha canina trípode, Lia. Vocês são o motivo do meu sorriso sempre que entro em casa. Tive a sorte de ter uma pessoa da qual aprendi,

e muito, não unicamente dentro do laboratório, mas também fora dele. Mateus, obrigada por me ajudar nos experimentos, mas, principalmente, muito obrigada por me trazer essa paz para a vida. Amo muito todos vocês.

Por fim, agradeço também à FAPESP (número de processo 2014/03281-3) pelo apoio financeiro.

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos é o inatingível.

Para os medrosos, o desconhecido.

Para os corajosos é a oportunidade.”

Víctor Hugo

RESUMO

DEL COLLADO, M B. **Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro* em bovinos**. 2017. 222 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Os mecanismos pelos quais a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos gera embriões com excessivo acúmulo lipídico, com elevado estresse celular e com reduzida criotolerância ainda são desconhecidos. Também permanece desconhecido quando essas alterações acontecem, se acontecem desde a maturação oocitária e o papel que as células do cumulus possuem neste mecanismo. O objetivo do presente trabalho foi estudar e comparar o metabolismo lipídico e homeostase celular, além dos perfis de miRNAs, durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial *in vivo* e *in vitro* em bovinos. Para isso, o trabalho foi dividido em 4 estudos. No Estudo 1, intitulado “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovinos” foram analisadas as células do cumulus e oócitos de complexos cumulus-oócitos (COCs) imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*. Foram realizadas análises de quantificação de lipídeos, espécies reativas de oxigênio (EROs), glutathiona reduzida (GSH), razão ATP/ADP assim como expressão de mRNAs e miRNAs relacionados com as vias de metabolismo e homeostase celular. A partir dos dados obtidos neste estudo, concluímos que a maturação *in vitro* (MIV) provoca aumento de lipídeos no COC, diminuição de GSH e da atividade mitocondrial nos oócitos, acompanhado por uma desregulação massiva das vias relacionadas a metabolismo e homeostase nas células do cumulus da MIV. No Estudo 2, intitulado “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3 - FABP3*) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos” foi constatado aumento do conteúdo lipídico e da expressão da FABP3 nas células do cumulus da MIV, quando comparado ao sistema *in vivo*. Ainda, imunolocalizamos a FABP3 dentro das projeções transzonais (TZPs) e verificamos um aumento concomitante da FABP3 e dos lipídeos oocitários nas primeiras 9 horas da MIV. Mediante a

remoção das TZPs às 9 horas da MIV e consequente diminuição lipídica observada no oócito, concluímos que existe um possível transporte de ácidos graxos a partir das células do cumulus até o oócito mediante FABP3 e TZPs. No Estudo 3, intitulado “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*”, verificamos que, mesmo utilizando um cultivo *in vitro* com baixa tensão de oxigênio e sem soro, os blastocistos da PIVE possuem maiores níveis de lipídeos e EROs que aqueles produzidos *in vivo*. Além disso, constatamos que essas alterações nos lipídeos durante a PIVE não estão acompanhadas de alterações de expressão, porém, existe um aumento na expressão de genes relacionados com estresse. No último estudo, “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”, constatamos as diferenças no perfil de miRNAs e nas vias reguladas por estes nas células do cumulus e oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* e em blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*. Verificamos uma maior regulação por miRNAs durante a maturação nas células do cumulus comparado ao oócito. Além do mais, tanto no COC quanto nos blastocistos, os miRNAs mostraram regular vias importantes do metabolismo, comunicação celular e vias de sinalização importantes para a maturação e desenvolvimento embrionário inicial. Conjuntamente, este trabalho permitiu elucidar as diferenças que a PIVE provoca no metabolismo e homeostase celular e na expressão de miRNAs.

Palavras chave: metabolismo, estresse celular, FABP3, lipídeos, miRNAs, produção *in vitro*, produção *in vivo*, complexo cumulus-oócito, blastocistos.

ABSTRACT

DEL COLLADO, M B. **Lipid metabolism and cellular stress during *in vivo* and *in vitro* oocyte maturation and embryo development in bovine**. 2017. 222 p. PhD. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The mechanism through which *in vitro* embryo production (IVEP) generates embryos with higher lipid accumulation, overstressed and with reduced cryotolerance is unknown. It is also unknown when these alterations take place, if occurs since the oocyte maturation and the role of cumulus cells in this mechanism are also unknown. The aim of the present work was to study and compare the lipid metabolism and cellular homeostasis, as well as the miRNAs profile during oocyte maturation and early *in vivo* and *in vitro* embryo development in bovines. For that, the present work was divided in 4 studies. In Study 1, entitled “*In vitro* maturation generates metabolically disrupted and overstressed cumulus-oocyte complexes in bovines” cumulus cells and oocytes from immature and *in vivo* and *in vitro* matured cumulus-cells complexes (COC) were analyzed. Analysis of lipid stores, oxygen reactive species (ROS), reduced glutathione and ATP/ADP ratio quantification, as well as mRNAs and miRNAs involved with metabolism and cellular homeostasis pathways were performed. From the obtained data in this study, we concluded that *in vitro* maturation (IVM) leads to an increase of lipids in the COC, a decrease of oocyte GSH and mitochondrial activity, as well as a massive deregulation in metabolism and homeostasis related pathways in MIV cumuls cells. In Study 2, “Fatty Acid Binding Protein 3 and transzonal projections are involved on lipid accumulation during *in vitro* maturation in bovine oocytes” we observed an increase of lipid accumulation and FABP3 expression in MIV cumulus cells when compared to the *in vivo* system. Furthermore, we immunolocalized the FABP3 inside the transzonal projections (TZPs) and verified a concomitant increase of FABP3 and oocyte lipids on the first 9 hours of MIV. By removing the TZPs at 9 hours of MIV and by the consequent lipid decrease observed in the oocyte, we concluded that there is a possible traffic of fatty acids from the cumulus cells to the oocyte

mediated by FABP3 and TZPs. In Study 3, entitled “Alterations in lipid metabolism and cellular homeostasis between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos”, we observed that, even though under serum free and low oxygen tension used during *in vitro* culture was used, IVP blastocysts had higher lipid and ROS levels than the counterparts produced *in vivo*. Moreover, we found that these lipid alterations during IVP are not followed by corresponding genes expression alterations, however, there is an increase of the expression of stress related genes. In the last study, “*in vitro* system alters miRNAs profile during oocyte maturation and early embryo development in bovines”, we observed differences in miRNAs profiles and in pathways modulated by them in *in vivo* and *in vitro* matured cumulus cells and oocytes and in *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts. We observed an intense miRNAs regulation during maturation in cumulus cells when compared to the oocyte. Furthermore, in both COC and blastocysts, miRNAs regulated important metabolism, cellular communication pathways, as well as important signaling pathways for maturation and early embryo development. Taken together, the findings of the present work allowed us to elucidate the differences caused by IVEP on cell metabolism and homeostasis as well as on miRNAs expression.

Keywords: metabolism, cellular stress, FABP3, lipids, miRNAs, *in vitro* production, *in vivo* production, cumulus-oocyte complexes, blastocyst.

SUMÁRIO

1.- INTRODUÇÃO.....	18
2.- REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1.- Maturação oocitária.....	20
2.1.1.- Aspectos gerais da maturação oocitária.....	20
2.1.2.- Comunicação dentro do complexo cumulus-oócito (COC).....	20
2.1.3.- Efeitos do ambiente <i>in vitro</i> sobre o COC.....	22
2.1.3.1.- Metabolismo e homeostase celular durante a maturação oocitária.....	24
2.1.3.2.- Mecanismos de acúmulo lipídico oocitário e o possível papel das <i>Fatty Acid Binding Proteins</i>	28
2.2.- Desenvolvimento embrionário inicial.....	29
2.2.1.- Alterações genéticas e epigénéticas durante cultivo <i>in vitro</i>	30
2.2.2.- Alterações metabólicas e de homeostase celular durante o cultivo <i>in vitro</i>	31
2.3.- miRNAs na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário: um mecanismo de controle pós-transcricional.....	33
3.- HIPÓTESES.....	35
3.1.- Hipótese do Estudo 1: “A maturação <i>in vitro</i> gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”.....	35
3.2.- Hipótese do Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação <i>in vitro</i> em oócitos bovinos”.....	35
3.3.- Hipótese do Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”.....	35
3.4.- Hipótese do Estudo 4: “O sistema <i>in vitro</i> altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”.....	35
4.- OBJETIVOS.....	36

4.1.- Objetivos do Estudo 1: “A maturação <i>in vitro</i> gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”	36
4.2.- Objetivos do Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação <i>in vitro</i> em oócitos bovinos”	36
4.3.- Objetivos do Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”	37
4.4.- Objetivos do Estudo 4: “O sistema <i>in vitro</i> altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”	37
5.- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
6.- MATERIAIS E MÉTODOS	41
6.1.- Animais	41
6.2.- Coleta de oócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	41
6.3.- Coleta de embriões produzidos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	42
6.3.1.- Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVE)	42
6.3.2.- Produção <i>in vivo</i> de embriões	44
6.4.- Estudo 1: “A maturação <i>in vitro</i> gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino ”	44
6.4.1.- Análises de espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em oócitos e células do cumulus.....	44
6.4.1.1.- Reagentes químicos	44
6.4.1.2.-Preparação da solução dos padrões internos	45
6.4.1.3.- Extração lipídica das amostras	45
6.4.1.4.- Análises	46
6.4.2.- Quantificação da glutathiona reduzida (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROs) por fluorimetria em oócitos imaturos e maturados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	46

6.4.3.- Quantificação do ATP, ADP e ATP/ADP por luminometria em oócitos imaturos e maturados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	47
6.4.4.- Extração do RNA total.....	47
6.4.5.- Transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA).....	48
6.4.6.- qPCR em tempo real (RT-qPCR) para análises de expressão de genes relacionados com metabolismo e homeostase celular em oócitos e células do <i>cumulus</i> imaturos e maturados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	48
6.4.7.- RT-qPCR para análises de expressão de miRNAs preditos que regulam genes relacionados com metabolismo e homeostase celular em oócitos e células do <i>cumulus</i> imaturos e maturados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	51
6.4.8.- Análises da metilação do DNA da região promotora do gene <i>CPT1A</i> nas células do <i>cumulus</i> por sequenciamento bissulfito.....	53
6.4.9.- Análises estatísticas.....	53
6.5.- Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação <i>in vitro</i> em oócitos bovinos”.....	54
6.5.1.- Quantificação lipídica e de níveis de FABP3 durante a maturação <i>in vivo</i> e MIV.....	54
6.5.1.1.- Quantificação lipídica dos oócitos por técnica fluorimétrica.....	54
6.5.1.2.- Quantificação da PLIN2 e FABP3 por western blot nas células do <i>cumulus</i>	55
6.5.1.3.- Análises de expressão da FABP3 nas células do <i>cumulus</i> e oócitos.....	56
6.5.2.- Imunolocalização da FABP3 nas TZPs e quantificação da FABP3 e lipídeo nos oócitos durante a MIV.....	56
6.5.2.1.- Imunolocalização da FABP3 dentro das TZPs nos COCs durante a MIV.....	56
6.5.2.2.- Quantificação lipídica nos oócitos.....	57
6.5.2.3.- Quantificação da FABP3 por western blot em oócitos.....	57
6.5.3.- Remoção das TZPs durante a MIV mediante citocalasina-B.....	58
6.5.4.- Análises estatísticas.....	58

6.6.- Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”.....	58
6.6.1.- Quantificação de EROs e GSH nos embriões produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	58
6.6.2.- Quantificação de lipídeos nos embriões de PIV e <i>in vivo</i>	59
6.6.3.- Análise de expressão de genes relacionados com metabolismo e homeostase celular.....	59
6.7.- Estudo 4: “O sistema <i>in vitro</i> altera o perfil de miRNAs durante a maturação oócitaria e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”.....	60
6.7.1.- Estudo do perfil de miRNAs nos oócitos e células do cumulus de COCs imaturos e maturados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	60
6.7.1.1.- Extração do miRNA e síntese de cDNA.....	61
6.7.1.2.- Expressão gênica dos miRNAs.....	61
6.7.1.3.- Análises dos dados.....	61
6.7.1.4.- Enriquecimento das vias reguladas pelos miRNAs estudados....	61
6.7.2.- Estudos do perfil de miRNA nos blastocistos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	62
6.7.2.1.- Extração de miRNA e síntese de cDNA.....	62
6.7.2.2.- Expressão relativa dos miRNAs bovinos.....	62
6.7.2.3.- Análises dos dados.	62
6.7.2.4.- Enriquecimento das vias reguladas pelos miRNAs estudados....	62
7.- RESULTADOS	63
7.1.- Estudo 1: “A maturação <i>in vitro</i> gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino ”.....	63
7.1.1.- O cultivo <i>in vitro</i> de COCs aumenta os DAGs e TAGs nos oócitos.....	63
7.1.2.- A MIV diminui os níveis de GSH e aumenta as EROs nos oócitos.....	65
7.1.3.- A MIV provoca diminuição da atividade mitocondrial nos oócitos.....	66

7.1.4.- A expressão gênica de genes relacionados com metabolismo e estresse celular não é alterada nos oócitos maturados <i>in vitro</i>	66
7.1.5.- A maioria dos miRNA apresentam níveis similares nos oócitos maturados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	67
7.1.6.- A MIV aumenta os TAGs nas células do cumulus.....	68
7.1.7.- A expressão dos genes relacionados com metabolismo e estresse celular apresentam-se alterados nas células do cumulus maturadas <i>in vitro</i>	70
7.1.8.- Expressão de miRNAs em oócitos e células do cumulus após maturação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	71
7.1.9.- A MIV não muda os padrões de metilação da região promotora do CPT1a nas células do cumulus.....	72
7.2.- Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação <i>in vitro</i> em oócitos bovinos”	73
7.2.1.- A MIV provoca aumento do conteúdo lipídico no COC.....	73
7.2.2.- A MIV aumenta os níveis de transcritos e proteína da FABP3 nas células do cumulus.....	74
7.2.3.- A FABP3 está localizada nas TZPs durante a MIV.....	75
7.2.4.- Os níveis proteicos da FABP3 e o conteúdo lipídico aumentam nas primeiras 9 horas da MIV nos oócitos.....	80
7.2.5.- A remoção das TZPs nos oócitos causa diminuição do conteúdo lipídico oocitário.....	82
7.3.- Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”.....	84
7.3.1.- A PIVE bovinos em baixa tensão de oxigênio acarreta em aumento de lípidos e de EROs quando comparado ao sistema <i>in vivo</i>	84
7.3.2.- A expressão dos genes relacionados com metabolismo lipídico e homeostase é pouco alterada na PIVE em baixa tensão de oxigênio.....	85
7.4.- Estudo 4: “O sistema <i>in vitro</i> altera o perfil de miRNAs durante a maturação oócitaria e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”.....	87

7.4.1.- Comparação do perfil de miRNAs dos oócitos durante a maturação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	87
7.4.2.- Comparação do perfil de miRNAs das células do cumulus durante a maturação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	93
7.4.3.- Comparação do perfil de miRNAs dos blastocistos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	106
8.- DISCUSSÃO	112
8.1.- Estudo 1: “A maturação <i>in vitro</i> gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino ”.....	112
8.2.- Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação <i>in vitro</i> em oócitos bovinos”.....	118
8.3.- Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”.....	122
8.4.- Estudo 4: “O sistema <i>in vitro</i> altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”....	124
9.- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
9.1.- Conclusões e considerações finais gerais	129
9.2.- Conclusões e considerações finais específicas de cada estudo	129
9.2.1.- Estudo 1: “A maturação <i>in vitro</i> gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”.....	129
9.2.2- Estudo 2.- ““A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i> - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação <i>in vitro</i> em oócitos bovinos””.....	130
9.2.3.- Estudo 3.- “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”.....	131
9.2.4.- Estudo 4- “O sistema <i>in vitro</i> altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”....	131
10.- REFERÊNCIAS	132
11.- APÊNDICE	156

12.- ANEXO..... 211

1.- INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia que representa não somente uma das ferramentas mais utilizadas dentro da agropecuária, mas também uma técnica em crescimento na área da reprodução humana. É conhecido pela comunidade científica que a PIVE está aquém do desejável, mostrando taxas de blastocistos e qualidade embrionária inferiores ao processo *in vivo*. Entre as limitações desta biotécnica, encontra-se o fato do cultivo *in vitro* gerar embriões com maiores conteúdos lipídicos e estressados com reduzida criotolerância e baixas taxas de prenhez (Goto *et al.*, 1993; Rizos, Fair, *et al.*, 2002; Seidel, 2006; Gad *et al.*, 2012; Prastowo *et al.*, 2016). Foi demonstrado que desde o início do processo, a maturação *in vitro* (MIV), o oócito acumula mais lipídeo comparado ao processo *in vivo*, inclusive quando a MIV é realizada na ausência do soro fetal bovino (SFB) (Del Collado *et al.*, 2016). Também se conhece que altos conteúdos lipídicos podem provocar estresse celular mediante o estresse do retículo endoplasmático, e já se sabe que esse mecanismo repercute negativamente na fertilidade (Wu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). Apesar dos esforços realizados para esclarecer como, quando e porque essas alterações acontecem, ainda hoje não se conhece plenamente este mecanismo e qual é o papel metabólico das células do cumulus no complexo cumulus-oócito (COC).

Além do metabolismo e homeostase celular, o cultivo *in vitro* altera seriamente a expressão gênica e epigenética embrionária (Niemitz e Feinberg, 2004; Gad *et al.*, 2012). Recentemente verificou-se o controle pós-transcricional que os miRNAs desempenham durante a PIV em bovinos, demonstrando regular vias importantes durante a maturação e desenvolvimento embrionário (Abd El Naby *et al.*, 2013; Gebremedhn, Pandey, *et al.*, 2016). No entanto, ainda não foi elucidado como o sistema *in vitro* influencia na expressão dos miRNAs ao longo do desenvolvimento.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o estudo e comparação da influência do cultivo *in vitro* no metabolismo e homeostase celular e o perfil de miRNA durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Para isso, foram coletados oócitos e células do cumulus de COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* e blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*. O trabalho foi dividido em quatro estudos. No primeiro estudo, intitulado “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovinos” foi

estudada a influência da MIV no acúmulo lipídico oocitário e nas células do cumulus, na quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathione reduzida (GSH) nos oócitos, e a expressão de mRNAs e miRNAs relacionados com metabolismo e homeostase celular nos oócitos e células do cumulus. Com os resultados do Estudo 1 foi gerado um artigo que se encontra submetido e em análise no periódico *Reproduction*.

No Estudo 2, “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3* - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”, após comparar os níveis de expressão da FABP3 e o conteúdo lipídico entre as células do cumulus e oócitos ao longo da maturação *in vivo* e *in vitro*, foi realizado um estudo para verificar o papel da FABP3 e das projeções transzonais (TZPs) no acúmulo lipídico oocitário. Este estudo comparou os níveis de FABP3 e lipídeos no oócito, assim como a presença da FABP3 nas TZPs nos COC imaturos, maturado *in vitro* por 9 horas e 18 horas. Por último foi realizado um estudo funcional, em que TZPs foram interrompidas, para verificar a dependência delas para o acúmulo lipídico acontecer. Este trabalho gerou um artigo recentemente publicado na *Scientific Reports* intitulado “Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes” que se encontra anexado no final desta tese (Anexo 1).

No Estudo 3 intitulado “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*” foram comparados os níveis de lipídeos, EROs e GSH, assim como os níveis de expressão dos genes relacionados com metabolismo e homeostase celular nos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

Por último, o Estudo 4 “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino” visou comparar a expressão de miRNAs e as vias reguladas por estes nas células do cumulus e oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*, assim como nos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

2.- REVISÃO DA LITERATURA

2.1.- Maturação oocitária

2.1.1.- Aspectos gerais da maturação oocitária

A maturação oocitária é o processo no qual o oócito adquire a competência para a fertilização e desenvolvimento embrionário. Tanto a foliculogênese (formação, crescimento e maturação dos folículos), quanto a oogênese (crescimento, capacitação e maturação do oócito) começam na fase fetal, antes do nascimento do animal. Ao nascimento, o ovário possui folículos primordiais tendo o oócito estacionado no processo meiótico na fase de diplóteno da Prófase I, também conhecida como a primeiro bloqueio meiótico (Gordon, 2003). A retomada da meiose somente irá ocorrer na puberdade do animal por estimulação hormonal. Após o crescimento folicular, o pico do hormônio luteinizante (LH) provoca a retomada da meiose, promovendo a quebra da vesícula germinativa (VG) e retomando a divisão meiótica até Metáfase II (MII), quando acontece a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Dekel, 2005). Neste momento a maturação oocitária, tanto nuclear como citoplasmática, estaciona-se novamente até o momento da fecundação, consistindo na segunda bloqueio meiótico.

2.1.2.-Comunicação dentro do complexo cumulus-oócito (COC)

O complexo cumulus-oócito é um complexo dinâmico onde existe uma grande comunicação entre células do cumulus e entre as células e o oócito. A obtenção de um oócito competente é consequência de uma sinalização e comunicação coordenada entre as diferentes células do folículo (Krisner, 2013). Ocorrendo perturbação desta sinalização, proteínas e membranas oocitárias e a função mitocondrial podem ser alteradas, repercutindo negativamente na qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário (Assou *et al.*, 2013; Dumesic *et al.*, 2015).

O crescimento e desenvolvimento do oócito é dependente da capacidade de sustentação do folículo, em particular das células da granulosa e cumulus (Sutton *et al.*, 2003).

Existem três possíveis tipos de comunicação celular: a parácrina, a mediada por junções comunicantes, e a recentemente proposta comunicação por microvesículas. Por muito tempo pensava-se que essa comunicação era desde a células do cumulus até o oócito, mas hoje sabemos que essa comunicação é bidirecional. O oócito secreta sinais parácrinos que são reguladores da função ovariana e das células da granulosa (Eppig, 2001). Membros da superfamília da TGF-beta, como o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) são secretados pelo oócito (Russell *et al.*, 2016). Estes fatores de crescimento não são unicamente importantes para a progressão de fases iniciais da foliculogênese, mas também para a diferenciação e função das células da granulosa e cumulus na fase de desenvolvimento folicular mais tardia (Dong *et al.*, 1996; Galloway *et al.*, 2000; Eppig *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2006).

Além dos sinais parácrinos, a comunicação pode ser mediada pelas junções comunicantes. As junções comunicantes são estruturas proteicas transmembranas formadas por conexinas. Essas junções permitem o transporte de moléculas entre as células da granulosa e as células do cumulus, e entre células do cumulus e o oócito (Herlands e Schultz, 1984). As moléculas transportadas pelas junções comunicantes incluem moléculas de baixo peso molecular (< 1 kDa) como íons, metabólitos e aminoácidos importantes para o desenvolvimento oocitário (Thomas *et al.*, 2004). Essas junções permanecem ativas até 6 horas da MIV quando ocorre a condensação da cromatina dentro da vesícula germinativa (VG) (Lodde *et al.*, 2013). As junções comunicantes podem estar presentes entre células do cumulus ou entre células do cumulus e oócito. Neste último caso, a corona radiata e o oócito comunicam-se mediante das projeções transzonais (TZPs), que podem terminar em junção comunicantes (De Loos *et al.*, 1989; De Loos *et al.*, 1991).

As TZPs são canais de comunicação sem a fusão de membranas, formadas por filamentos de actina, de aproximadamente 2 μ m de diâmetro que permitem o transporte de moléculas grandes, tais como mRNAs (Macaulay *et al.*, 2014). Estima-se que um COC possua mais de 3.000 TZPs e que estas mantenham o transporte

ativo até as 9 horas da maturação. A partir deste momento, após a retomada da meiose, o transporte diminui, sendo que as TZPs desfazem-se gradualmente até as 22 horas da maturação quando não se detectam mais (Macaulay *et al.*, 2014). Ao contrário do que se acreditava, estas TZPs permitem que as células do cumulus participem da formação da reserva de transcritos do oócito, mesmo quando este já esteja transcricionalmente inativo, contribuindo para o desenvolvimento e a maturação oocitária (Macaulay *et al.*, 2016).

O terceiro tipo de transporte possível dentro do COC, o transporte mediado por vesículas secretadas pelas células (vesículas extracelulares), foi recentemente proposto. Apesar de que ainda não se tenha constatado o transporte de vesículas extracelulares entre células do cumulus e oócito, estas já foram identificadas em líquido folicular em equinos (Da Silveira *et al.*, 2012), bovinos (Sohel *et al.*, 2013) e humanos (Sang *et al.*, 2013). Além disso, foi constatada a capacidade destas vesículas entrarem nas células da granulosa *in vitro* e *in vivo* (Da Silveira *et al.*, 2012; Soheli *et al.*, 2013) e foram encontradas no final das TZPs na fenda que compõe a denominada sinapse-gamética (Macaulay *et al.*, 2014). Tudo isso nos faz pensar que a comunicação mediada por vesículas secretadas por células possa estar acontecendo dentro do COC. Essas vesículas transportam proteínas, miRNAs e mRNAs, protegidos pela bicamada lipídica que as delimitam (Taylor e Gercel-Taylor, 2013).

2.1.3.- Efeitos do ambiente *in vitro* sobre o COC

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos ainda está aquém do desejável, sendo que somente 40-50% dos oócitos maturados *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto (Rizos, Fair, *et al.*, 2002). Por outro lado, a obtenção de oócitos maturados *in vivo* foi responsável pelo aumento de 20% na taxa de blastocisto, demonstrando que a maturação oocitária, é crítica para atingir melhores taxas de desenvolvimento (Rizos, 2002). Portanto, a maturação oocitária é um dos determinantes de qualidade mais precisos dentro da biologia do desenvolvimento embrionário. Durante a maturação, o oócito adquire condições que serão determinantes não somente até a ativação do genoma embrionário, mas também ao longo do desenvolvimento até o

estádio de blastocisto, por ser o gameta feminino o doador de citoplasma durante a formação inicial do embrião (Gilbert, 2003).

A maturação oocitária é dividida entre maturação nuclear, citoplasmática e molecular, que ocorrem de maneira simultânea (Gordon, 2003). Na MIV, os oócitos aspirados, que encontram-se em diferentes fases da oogênese, após serem retirados do ambiente folicular, iniciam o processo de retomada da meiose (Pincus e Enzmann, 1935). Isso faz com que alguns oócitos alcancem a MII prematuramente, isto é, sem que seja acompanhada pela maturação citoplasmática. Por outro lado, durante a maturação, ocorrem várias alterações nos oócitos em nível molecular, que compreendem o padrão de transcrição, acúmulo e processamento dos mRNA que se traduzirão em proteínas pelos ribossomos (Ferreira *et al.*, 2009)

O oócito, aprisionado na fase de diplóteno da Prófase I, é transcricionalmente ativo até o pico pré-ovulatório do LH. A transcrição cessa junto com a condensação do DNA na quebra da vesícula germinativa, convertendo-se em transcricionalmente inativo até a ativação do genoma embrionário. Apesar disso, existem trabalhos que relataram diferenças entre oócitos em VG e MII em oócitos humanos, murinos e bovinos (Assou *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007; Adona *et al.*, 2016). No entanto, mais do que uma possível transcrição oocitária, poderíamos pensar em um transporte de mRNA desde as células do cumulus até o oócito mediante TZPs como proposto por Macaulay *et al.* (2016).

Ainda, oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado diferentes perfis de mRNA. Genes *imprinted* como o *IGF2R*, *PEG3*, *SNRPN* e *H19* e genes reguladores da metilação do DNA (*DNMT1a*, *DNMT1b*, *DNMT3a* e *DNMT3b*) tem mostrado maiores níveis de expressão em oócitos maturados *in vitro* quando comparado aos *in vivo* (Katz-Jaffe *et al.*, 2009; Heinzmann *et al.*, 2011). Além de alterações na expressão de genes relacionados com marcas epigenéticas, a MIV também provocou uma diminuição de genes relacionados com o ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) e fosforilação oxidativa (Katz-Jaffe *et al.*, 2009), demonstrando que o sistema *in vitro* altera as vias de metabolismo celular no oócito.

Sobre a maturação citoplasmática, as organelas citoplasmáticas sofrem modificações, podendo variar em número e/ou distribuição (Ferreira *et al.*, 2009). Existem evidências de que essas modificações ocorrem de forma diferente na

maturação *in vivo* e *in vitro*: nosso grupo de pesquisa verificou alterações na migração e quantificação de mitocôndrias ativas e lipídeos durante a MIV (Del Collado *et al.*, 2016). Essas evidências de alterações no comportamento lipídico e mitocondrial sugerem mudanças na produção de energia, podendo repercutir negativamente no desenvolvimento embrionário.

2.1.3.1.- Metabolismo e homeostase celular durante a maturação oocitária

Os lipídeos majoritários nos oócitos e embriões são os triacilgliceróis (TAG), frequentemente localizados em gotas lipídicas no citoplasma (Ferguson e Leese, 1999). A gota lipídica é composta por um núcleo hidrofóbico de lipídeos neutros, tais como TAG e ésteres, rodeados por uma parte anfipática formada por uma monocamada de fosfolipídeos, colesterol e proteínas (BROWN, 2001 e MARTIN *et al.*, 2006).

Os TAG são formados na membrana microssomal do retículo endoplasmático (RE), onde a gota irá se formar (MARCHESAN *et al.*, 2003). Os TAG são compostos por um glicerol que tem esterificados seus três grupos hidroxilas por três ácidos graxos, saturados ou insaturados.

As “*PAT Proteins*” são proteínas localizadas ao redor da gota lipídica (BICKEL *et al.*, 2009). Entre elas a encontra-se a Perilipina 2 (PLIN2), essa proteína é relacionada com o tamanho e a quantidade das gotas lipídicas na célula, e está envolvida na limitação da interação entre lipases e gotas lipídicas (BICKEL *et al.*, 2009). A proteína PLIN 2 já foi identificada em oócitos (AARDEMA *et al.*, 2011) e sabe-se que além de estar presente no oócito, também é encontrada em células do *cumulus* e embriões bovinos (Del Collado *et al.*, 2016)

O fator de transcrição SREBF1 (sterol regulatory elemento binding proteins 1) está envolvido no controle da expressão de varias enzimas relacionadas com a síntese de ácidos graxos e TAG, como a acetil-CoA descarboxilase (ACACA) a ácido graxo sintetase (FASN), entre outras, e portanto está diretamente envolvido na lipogênese (Suzuki *et al.*, 2012).

Em situações de demanda energética, ácidos graxos são metabolizados na mitocôndria mediante a oxidação (Downs *et al.*, 2009, Dunning *et al.*, 2010 e Dunning *et al.*, 2014). O ácido graxo que irá se oxidar pode ser proveniente da quebra da gota lipídica mediante lipases ou da biossíntese celular. O precursor da síntese de ácidos

graxos é o acetil-CoA que, mediante a enzima acetil-CoA descarboxilase (ACACA), é convertido em Malonil-CoA e este pela sua vez em ácido graxo mediante a ação da ácido graxo sintetase (FASN). Em caso de requerimento energético, o ácido graxo é metabolizado a acil-CoA graxo, que será transportado até o interior da mitocôndria mediante carnitina e o receptor celular chamado carnitina palmitoil tranferase 1 (CPT1), formando-se o acil-carnitina. Uma vez na fase intermembranosa, o acil-carnitina é transportado para a matrix mitocondrial mediante um segundo receptor, a carnitina palmitoil tranferase 2 (CPT2), localizada na membrana interna e que permite que se libere o acil-CoA graxo que será oxidado.

A oxidação do acil-CoA graxo e geração do ATP possui três etapas: primeira, a β -oxidação, onde o acil-CoA é oxidado a acetil-CoA. Tem que se mencionar que o acetil-CoA pode ter origem da metabolização do ácidos graxo ou do piruvato da glicólises. A segunda etapa é a oxidação do acetil-CoA no ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) onde serão gerados doadores de elétrons (NADH e FADH₂) e a terceira etapa, na cadeia transportadora de elétrons onde, durante a fosforilação oxidativa, o ADP é convertido em ATP (Downs *et al.*, 2009; Dunning *et al.*, 2010; Dunning *et al.*, 2014).

Como mencionado, o complexo cumulus-oócito é um complexo dinâmico onde existem diversas vias de comunicação celular. Por ser assim, pouco se sabe acerca das necessidades metabólicas do oócito na maturação, ou do papel das células do cumulus no metabolismo energético. Deve-se levar em consideração a complexidade de se estudar o metabolismo das células do cumulus e do oócito, separadamente, devido a toda essa comunicação existente no complexo. Assim sendo, a maioria dos estudos sobre metabolismo celular exploram apenas a maturação *in vitro*, fazendo evidente uma lacuna sobre o que é fisiológico e o que não é quando discutimos sobre metabolismo oocitário.

O conceito amplamente aceito sobre metabolismo é que o oócito é incapaz de metabolizar a glicose, e que são as células do cumulus que realizam a função glicolítica (Khurana e Niemann, 2000; Thompson *et al.*, 2000; Cetica *et al.*, 2002). De fato, a atividade glicolítica só se estabelece no embrião a partir da compactação. Enzimas da via glicolítica, como a fosfofrutoquinase (PFK) e a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) tem maior atividade nas células do cumulus comparado ao oócito (Cetica *et al.*, 2002). Assim, o modelo de entendimento atual propõe que as

células do cumulus fornecem produtos do metabolismo da glicólise, como piruvato e lactato, ao oócito para metabolização mediante a fosforilação oxidativa. Este conceito, no entanto, desconsidera a importância de outra via do metabolismo energético durante a maturação, a beta-oxidação. A beta-oxidação dos ácidos graxos é um processo oxidativo cerca de três vezes mais eficiente em gerar ATP do que a glicólise (Dunning *et al.*, 2010).

Como mencionado, não há dúvidas de que durante a PIVE em bovinos existe um maior acúmulo de lipídico pelo embrião quando comparado ao processo *in vivo* (Rizos, Fair, *et al.*, 2002). O aumento de lipídeos neutros durante a PIVE é normalmente relacionada com a utilização do SFB nos meios de cultivo, provocando a baixa criotolerância desses embriões (Pollard e Leibo, 1994; Abe *et al.*, 2002; Rizos, Fair, *et al.*, 2002). Os ácidos graxos intracitoplasmáticos penetram nas membranas dos blastocelos, mudando sua composição e as fazendo menos resistentes a esta técnica (Mucci *et al.*, 2006). Autores apontam que esses lipídeos danificam os mecanismos celulares responsáveis por reparar as membranas plasmáticas depois da criopreservação (Mucci *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2008). Por isso, há décadas tenta-se entender como e quando acontece esse acúmulo lipídico na PIVE e como evitá-lo. No entanto, e apesar da extensão de pesquisas relacionadas ao metabolismo oocitário e embrionário, ainda hoje existem lacunas relacionadas ao metabolismo oocitário e como o sistema *in vitro* interfere nele.

Nos bovinos, estudos mais antigos relatavam uma diminuição dos TAG durante a MIV (Ferguson e Leese, 1999; Kim *et al.*, 2001). No entanto, estudos mais recentes, relatam um aumento dos lipídeos durante esta fase, inclusive com a ausência do soro no meio de maturação (Aardema *et al.*, 2011; Del Collado *et al.*, 2016). Também foi relatado que esse aumento não acontece durante sistema *in vivo* (Del Collado *et al.*, 2016). Isso nos faz nos pensar que, além de incorporar lipídeos do meio externo, o COC cultivado *in vitro* tem alterada a maquinaria celular e/ou molecular relacionada com vias de metabolismo.

Adicionalmente, o uso de estimulantes da beta-oxidação durante a MIV provoca redução de acúmulo lipídico em oócitos durante a maturação e embriões em desenvolvimento, com efeitos positivos nas taxas de desenvolvimento (Somfai *et al.*, 2011; Chankitisakul *et al.*, 2013; Paczkowski *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2013).

Assim, o papel do metabolismo lipídico durante a maturação oocitária vem ganhando importância, e há evidências de que o sistema de maturação *in vitro* provoca alterações nas vias de beta-oxidação e de acúmulo lipídico.

Sabe-se ainda que o aumento de lipídeos provoca nas células um estresse do retículo endoplasmático (RE). Foi verificada a relação entre altas quantidades de lipídeos no fluido folicular com o estresse do RE nos oócitos, e consequentemente com as baixas taxas de maturação e fertilidade (Wu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). Se a célula não consegue combater esse estresse, ativa-se na célula a via de morte celular programada a partir do retículo endoplasmático (Malhotra e Kaufman, 2007; Bravo *et al.*, 2012). A via de apoptose celular tem seu início com a ativação de duas quinases, IRE1 e PERK, e um fator de transcrição, a ATF6. O PERK e ATF6 estimularão a ativação transcricional do CHOP10 (Ma *et al.*, 2002). O CHOP10 induzirá a apoptose mediante ativação de genes apoptóticos (GADD34, DR5, TRB3) e inibição da expressão dos anti-apoptóticos (BCL2) (Malhotra e Kaufman, 2007). Nesta situação, haverá liberação dos estoques de Ca^{+2} para o citoplasma. O Ca^{+2} , na mitocôndria, induz a depolarização da membrana, a geração de novas espécies reativas de oxigênio (EROs), a ativação da caspase 9 (Malhotra e Kaufman, 2007). O IRE1 ativará também a via da caspase 12, que juntamente com a caspase 9 determinarão a apoptose celular (Yoneda *et al.*, 2001).

Além do acúmulo lipídico, o estresse do RE pode ser consequência e/ou causa do estresse oxidativo celular. Chama-se de estresse oxidativo quando a célula não possui antioxidantes suficientes para neutralizar EROs geradas pela célula. As EROs são geradas de forma fisiológica durante a respiração celular, quando o oxigênio molecular (dioxigênio, O_2) é reduzido por elétrons liberados formando o superóxido O_2^- . A partir daí o superóxido pode ser derivado em outras moléculas formando várias EROs como o HO ou H_2O_2 . (Al-Gubory *et al.*, 2010).

Em toda célula existem antioxidantes que reverterem essa situação. No caso do oócito e embrião, o antioxidante maioritário é a glutatona reduzida (GSH). Os estoques de GSH são formados durante a maturação desde VG até MII, e sabe-se que após a maturação a síntese de GSH é silenciada até a ativação do genoma embrionário (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2011). Portanto, após o estágio de duas células, o embrião pode não ser capaz de eliminar a quantidade de EROs gerada, causando

efeitos deletérios durante o desenvolvimento, observando-se a importância de neutralizar os EROs já desde a MIV.

Dentro do cultivo *in vitro* existem vários precursores de EROs: a oxidação dos ácidos graxos, os meios de cultivo, a tensão de oxigênio, drogas e químicos, disfunções metabólicas, mal dobramento proteico etc. (Agarwal *et al.*, 2006; Malhotra e Kaufman, 2007; Combelles *et al.*, 2009). Recentemente se tem verificado a relação positiva entre embriões que possuem um antioxidante que combate o estresse oxidativo e do retículo endoplasmático, o *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (NRF2), com sua competência (Amin *et al.*, 2014).

Dessa forma, podemos observar a estreita relação entre o metabolismo lipídico, o estresse do retículo endoplasmático, o estresse oxidativo e a apoptose celular. Porém, não está claro como essa interação celular acontece durante a MIV, começando pelo metabolismo lipídico dentro do COC, o que ainda hoje considera-se uma incógnita.

2.1.3.2.- Mecanismos de acúmulo lipídico oocitário e o possível papel das *Fatty Acid Binding Proteins*.

Mesmo que tenha sido relatado que a MIV provoca um aumento lipídico oocitário que não acontece no sistema *in vivo* (Del Collado *et al.*, 2016) e tenha sido observado esse acúmulo inclusive no meio de maturação sem soro (Aardema *et al.*, 2011; Del Collado *et al.*, 2016), ainda não foi elucidado o mecanismo de como isso acontece, e o papel das células do cumulus neste acúmulo.

Existem três mecanismos possíveis de acúmulo lipídico: primeiramente, o aumento da síntese de lipídeos no oócito. Segundo, uma diminuição da oxidação dos ácidos graxos, a beta-oxidação, e por último a incorporação destes lipídeos desde o meio, ou desde as células do cumulus.

Apesar de existirem poucos relatos sobre a capacidade do oócito de sintetizar lipídeos, Auclair *et al.* (2013) descreveram o aumento da proteína ácido graxo sintetase (FASN) durante a MIV nos oócitos, demonstrando que o oócito pode ser capaz de sintetizar ácidos graxos e do possível aumento de síntese durante a MIV.

Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o acúmulo acontece sem suplementação de soro fetal bovino, sugerindo um aumento na síntese lipídica (Del Collado *et al.*, 2016).

A diminuição da beta-oxidação está bem suportada pela literatura. Estudos realizados com camundongos descreveram uma diminuição da beta-oxidação e da expressão dos genes relacionados a ela durante a MIV quando comparado ao sistema *in vivo* (Dunning *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado por Somfai *et al.* (2011) que o aumento da beta-oxidação nesta fase diminui o conteúdo lipídico oocitário.

Por último, e o menos explorado, o possível transporte de ácidos graxos até o oócito. Já foi demonstrado que, dependendo do suplemento utilizado durante a MIV, o acúmulo lipídico é diferente, sendo que, na presença do soro, há um aumento quando comparada à MIV com BSA (Del Collado *et al.*, 2016), sugerindo um transporte de lipídeos desde o meio. A dúvida persiste se existe também transporte de lipídeos desde as células do cumulus até o oócito.

Dentro deste contexto, as proteínas com potencial de transporte de ácidos graxos dentro do COC são as proteínas da família *Fatty Acid Binding Proteins* (FABPs). Nestas proteínas ancoram-se majoritariamente ácidos graxos de cadeia longa (C16-C20) que são transportados até a mitocôndria, peroxissomo, retículo endoplasmático ou gotas lipídicas. Além desse transporte intracelular, as FABPs são capazes de conduzir o transporte extracelular, livre ou dentro de vesículas extracelulares, em diferentes tecidos e fluidos corporais (Hertzel e Bernlohr, 2000; Hotamisligil e Bernlohr, 2015a) mostrando uma função pleiotrópica dentro do sistema metabólico. A isoforma 3, também chamada FABP3 ou FABP-cardíaca, parece ter um papel importante dentro do COC, sendo que foi a única isoforma cuja expressão apresentou aumento durante a MIV (Sanchez-Lazo *et al.*, 2014). A FABP3 tem apenas 133 aminoácidos e um peso molecular de 15k kDa, o que faz dela uma boa candidata para transportar ácidos graxos dentro do COC, talvez por TZPs e/ou por vesículas.

2.2.-Desenvolvimento embrionário inicial

Após a fecundação, durante o desenvolvimento embrionário inicial, o zigoto

sofre diversas divisões mitóticas organizadas até a formação do blastocisto. Nesta fase, as células, chamadas de blastômeros, passam por diversas mudanças celulares e moleculares para poderem se diferenciar, primeiramente, entre células da massa celular interna (MCI) que irá formar o futuro feto, e trofoectoderma (TE) que é responsável por formação da placenta. Além do mais, até a ativação do genoma embrionário, que no bovino se dá, com maior intensidade, a partir da formação do embrião de 8 células, o embrião é totalmente dependente do estoque de mRNAs e proteínas de origem oocitária. Sendo que a fase de desenvolvimento é a mais dinâmica e onde maiores mudanças acontecem dentro das células embrionárias, pode-se imaginar a susceptibilidade desta fase a sofrer alterações por parte do sistema *in vitro*.

2.2.1.- Alterações genéticas e epigénéticas durante cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* no qual os oócitos e embriões são submetidos provocam, além de alterações citoplasmáticas, modificações genéticas e epigenéticas. Como mencionado anteriormente, durante esta fase ocorre a ativação do genoma embrionário e o perfil de transcritos muda drasticamente (Kues *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014). Assim, vários grupos de pesquisa têm notado alterações no transcriptoma de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Corcoran *et al.*, 2006; Gad *et al.*, 2012). Ainda, tem se mostrado que quando submetemos o zigoto produzido *in vitro* ao ambiente *in vivo*, o transcriptoma dele difere daqueles que continuaram o cultivo *in vitro*, demonstrando a influência do ambiente do cultivo embrionário isoladamente (Lonergan *et al.*, 2003). Sabe-se também que o meio de cultivo utilizado pode afetar os níveis de transcritos nos blastocistos (Rizos *et al.*, 2003).

Além de modificações genéticas, o cultivo *in vitro* mostrou alterar a epigenética embrionária. Tais modificações levam à ocorrência de distúrbios do desenvolvimento, notavelmente nos bezerros oriundos desta técnica (Manipalviratn *et al.*, 2009). Alguns genes, como os *imprinted*, estão regulados mediante a metilação do DNA fazendo com que alguns genes sejam funcionais num único alelo específico, enquanto o outro é silenciado (Li *et al.*, 1993). Uma das síndromes com maior incidência e provocada por alteração de um gene *imprinted* durante a PIVE é a “síndrome do bezerro grande”.

Esta síndrome é provocada pelo aumento na expressão do gene *imprinted* IGF2R durante o cultivo *in vitro*, sendo essa alteração associada ao uso do soro nos meios de cultivo (Young *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2001).

2.2.2.- Alterações metabólicas e de homeostase celular durante o cultivo *in vitro*.

Como mencionado, a PIVE bovinos provoca aumento do acúmulo lipídico e estresse celular nos blastocistos (Goto *et al.*, 1993; Rizos, Fair, *et al.*, 2002; Seidel, 2006; Gad *et al.*, 2012; Prastowo *et al.*, 2016). Gad *et al.* (2012) observaram que as vias mais alteradas durante o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, quando comparado ao sistema *in vivo*, eram vias de metabolismo lipídico e vias antioxidantes, como a via do NRF2. Trabalhos mostraram que o uso do SFB durante o CIV aumenta o acúmulo lipídico, prejudicando a criotolerância desses embriões (Sata *et al.*, 1999; Rizos, 2002; Gomez *et al.*, 2008). Por isso, tem se apontado ao uso do soro durante o CIV como principal causa do excessivo acúmulo lipídico dos embriões PIVE. Já foi mencionado que a glicólise é efetivada a partir da compactação da mórula. Estudos em bovino demonstraram que blastocistos produzidos *in vitro* tem a glicólise aumentada quando comparado aos embriões do sistema *in vivo* (Khurana e Niemann, 2000). Ainda, o mesmo trabalho indica que no cultivo *in vitro* de embriões produzidos *in vivo* essa via é estimulada e os níveis de lactato produzidos assemelham-se àqueles encontrados nos embriões *in vitro*. Desse modo, fica evidente que o sistema *in vitro* altera não apenas o metabolismo lipídico, mas também a via glicolítica.

Além do efeito prejudicial do SFB, sabe-se que a alta tensão de oxigênio que costuma-se usar no CIV, tensão 20% em ar, é uma das causas mais importante do estresse oxidativo nos blastômeros de embriões de PIVE (Goto *et al.*, 1993). Um excesso de EROs tem consequências negativas tanto para a célula quanto para o desenvolvimento embrionário. O aumento destas espécies aumenta a peroxidação lipídica celular prejudicando a divisão celular, transporte de metabólitos e provocando uma disfunção mitocondrial (Guerin *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que altos níveis de EROs podem alterar a função do DNA mitocondrial e pode bloquear o desenvolvimento embrionário (Guerin *et al.*, 2001). Ainda, as EROs são capazes de aumentar a taxa de fragmentação e apoptose celular embrionária (Yang *et al.*, 1998;

Yang e Rajamahendran, 1999)

Sabe-se que a tensão de oxigênio dentro do oviduto nas diferentes espécies é igual ou menor de 7% (Harvey, 2007). Foi demonstrado que os embriões bovinos cultivados em menores tensões de oxigênio (5%), mais próximos ao fisiológico, apresentam menores níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), menores níveis de expressão de genes relacionados com estresse do retículo endoplasmático, assim como menores níveis de apoptose celular e aumento do número de células (Gardner e Lane, 1996; Van Soom *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2014). Além de conseguir embriões de melhor qualidade, realizar o CIV a 5% de O₂ aumenta as taxas de blastocisto e de prenhez quando comparado à PIVE em alta tensão, 20% (Dumoulin *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2014).

As razões para as diferenças encontradas no metabolismo celular entre embriões produzidos em alta e baixa tensão de oxigênio são relativamente pouco compreendidas. Sabe-se apenas que embriões produzidos em baixa tensão têm aumentada a eficiência de utilização da glicose e oxidação do piruvato quando comparado aos produzidos em 20% de O₂ (Khurana e Wales, 1989; Harvey, 2007). Apesar de saber que o CIV em baixa tensão de oxigênio e em ausência de SFB produz embriões de melhor qualidade e com menores quantidades de lipídeo, ainda não se sabe o quão similar esse sistema consegue ser ao encontrado fisiologicamente e se esse sistema *in vitro* altera o metabolismo e homeostase celular.

2.3.- miRNAs na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário: um mecanismo de controle pós-transcricional.

Está estimado que entre 30-90% dos mRNAs são susceptíveis a serem regulados mediante microRNAs (miRNAs), podendo cada mRNA ser regulado por vários miRNA e cada miRNA podendo modular a tradução de vários mRNA (Baley e Li, 2012). Os miRNAs são pequenos RNAs (19-25 pb) cuja função é regular a expressão de outros mRNAs inibindo ou diminuindo sua tradução (Fire *et al.*, 1998; Hwang e Mendell, 2007; Williams *et al.*, 2009). A sua biossíntese ocorre no núcleo por a RNA polimerase II, e é processado pela Drosha gerando o miRNA precursor

(pre-miRNA) com a característica de *hairpin*. Este pre-miRNA é exportado para o citoplasma mediante a atividade da proteína Exportina 5 e clivado pelo Dicer resultando no miRNA maduro. O complexo de proteínas Argonautas, complexo RISC, é o responsável pela união do miRNA na região 3'UTR do mRNA alvo (Baley e Li, 2012). Assim, o miRNA, dependendo da complementariedade com o mRNA, irá degradá-lo (quando a complementariedade é completa, mais comum em plantas) ou diminuir a sua tradução (complementariedade incompleta, comum em animais) (Hwang e Mendell, 2007).

Como mencionado, o crescimento e desenvolvimento folicular e oocitário é dependente da coordenação temporal e espacial de várias vias moleculares e celulares que ocorrem dentro do ovário e folículo. Por isso, ao longo do desenvolvimento folicular e oocitário a expressão gênica é dinâmica. Essa expressão pode estar modulada, em parte, por mecanismos pós-transcricionais, entre eles, os miRNAs (Baley e Li, 2012; Imbar e Eisenberg, 2014; Gebremedhn, Pandey, *et al.*, 2016). Esta expressão pode não só estar regulada pelos miRNAs, mas também pelos fatores envolvidos na biossíntese deles. Foi demonstrado que o *knockout* para DICER no ovário resulta na foliculogênese e maturação oocitária anormal e infertilidade (Nagaraja *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2010).

Além de regular a função ovariana, miRNAs tem demonstrado modular a dominância folicular. O grupo de Gebremedhn *et al.* (2015) observou diferentes perfis de miRNAs entre as células da granulosa de folículos dominantes e subordinados. Ainda, vários *clusters* de miRNAs tem se relacionado com a proliferação e diferenciação das células da granulosa e cumulus mediante a modulação da expressão de genes como o FoxO, PTEN e BMPR2 (Andreas *et al.*, 2016; Gebremedhn, Salilew-Wondim, *et al.*, 2016).

Sobre a função dos miRNA durante a maturação oocitária, sabe-se que o perfil de miRNAs sofre mudanças durante a maturação oocitária sendo que se observaram diferenças no perfil de miRNAs entre oócitos imaturos e em MII (Tesfaye *et al.*, 2009). Além disso, tem sido demonstrada a função específica de alguns miRNAs sobre a maturação. O miRNA-378 demonstrou regular a maturação oocitária suprimindo a expressão da aromatase (Pan *et al.*, 2015) e o miR-27b-3p mediante a modulação do PPAR γ (Song *et al.*, 2016). Além do mais, um estudo possibilitou manipular a taxa de

maturação nuclear oocitária mediante a transfecção de miRNA ocorrendo aumento ou diminuição da taxa de oócitos em MII dependendo do miRNAs transfectados (Kim *et al.*, 2013). Tudo isso demonstra o papel importante que os miRNAs desempenham durante a maturação oocitária.

Os miRNAs não são, porém, apenas reguladores da maturação. Quando os miRNAs maternos, oocitários, são depletados da célula, o zigoto formado não conseguiu realizar a primeira clivagem, demonstrando que miRNAs maternos tem um papel modulador importante no desenvolvimento embrionário inicial (Tang *et al.*, 2007). Além do mais, a expressão de miRNAs ao longo do desenvolvimento demonstrou ser um mecanismo dinâmico, sendo que recentemente verificou-se as diferenças no perfil de expressão dos miRNAs ao longo do desenvolvimento embrionário (Tesfaye *et al.*, 2009; Abd El Naby *et al.*, 2013; Goossens *et al.*, 2013). Ainda, sabe-se que existe uma regulação na expressão dos miRNAs dirigida pelo ambiente no qual o embrião encontra-se, sendo que foi descrito que os embriões desenvolvidos em diferentes tensões de oxigênio, possuem diferentes perfis de miRNA (Bomfim, 2017).

Do mesmo modo, foram identificados miRNAs liberados pelos embriões que poderiam ser usados como biomarcadores da implantação, sendo que já se conhecem miRNAs relacionadas com esse processo (Rosenbluth *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Apesar de terem sido identificados miRNAs regulando a função ovariana e folicular, a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, e inclusive a implantação e manutenção da prenhez (Tesfaye *et al.*, 2016), ainda hoje não foram totalmente elucidadas as implicações do sistema *in vitro* no perfil de miRNAs durante a maturação e desenvolvimento embrionário inicial. Sabendo da possível comunicação celular mediante vesículas contendo miRNAs, e conhecendo que o próprio ambiente *in vitro* pode alterar a expressão gênica, cabe pensar que o meio *in vitro* possa mudar o perfil de miRNAs durante a PIVE. Elucidar essas diferenças seria importante não somente para utilizá-los como biomarcadores, mas também para estudar as vias diferentemente reguladas por miRNAs no sistema *in vitro* e *in vivo*, para futuramente poder manipulá-las.

3.- HIPÓTESES

3.1.- Hipótese do Estudo 1: “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”

A maturação *in vitro* provoca aumento do acúmulo lipídico e estresse celular e diminuição da atividade mitocondrial no complexo cumulus-oócito quando comparado ao sistema *in vivo*.

3.2.- Hipótese do Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3* - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”.

A FABP3 carrega ácidos graxos desde as células do cumulus até o oócito. Esse transporte está aumentado durante a MIV quando comparado ao sistema *in vivo*.

3.3.- Hipótese do Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*”

Os embriões produzidos *in vitro* tem as vias do metabolismo lipídico e de homeostase alteradas provocando aumento do conteúdo lipídico e de EROs e diminuindo os níveis de antioxidante quando comparado ao sistema *in vivo*.

3.4.- Hipótese do Estudo 4: “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”.

O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNA desde a maturação até o desenvolvimento embrionário em bovinos.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivos do Estudo 1: “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”

4.1.1.- Objetivo geral

Determinar os efeitos da maturação *in vitro* sobre o metabolismo e homeostase celular nas células do cumulus e oócitos.

4.1.2.- Objetivos específicos

- Determinar as quantidades lipídicas nos oócitos e células do cumulus de COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* mediante HPLC-MS.
- Quantificar as EROs e GSH nos oócitos de COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* mediante técnicas fluorimétricas.
- Determinar e comparar níveis de ATP e ADP nos oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* mediante luminometria
- Determinar e comparar a expressão de mRNA e miRNA relacionados com metabolismo e estresse celular.

4.2.- Objetivos do Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3 - FABP3*) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”

4.2.1.- Objetivo geral

Estudar o papel da FABP3 no transporte de ácidos graxos desde as células do cumulus até o oócito.

4.2.2.- Objetivos específicos

- Determinar e comparar os níveis de expressão gênica e proteica da FABP3 entre a maturação *in vivo* e *in vitro* por RT-qPCR e western blot.
- Quantificar os lipídeos citoplasmáticos nos oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* por técnicas fluorimétricas; e estimar acúmulo lipídico nas células do cumulus destes mesmo grupos mediante determinação dos níveis de PLIN2 por western blot.
- Imunolocalizar a FABP3 nas TZPs ao longo da MIV.
- Quantificar a FABP3 e os lipídeos nos oócitos imaturos e com 9 e 18 horas de MIV por western blot e técnicas fluorimétricas.
- Estudar a dependência da presença das TZPs para a ocorrência do transporte de FABP3 desde as células do cumulus até o oócito.
- Analisar a quantidade lipídica oocitária quando as TZPs são interrompidas durante a MIV.

4.3.- Objetivos do Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*”

4.3.1.- Objetivo geral

Determinar os efeitos do cultivo *in vitro* sobre o metabolismo e homeostase nos blastocistos.

4.3.2.- Objetivos específicos

- Quantificar e comparar as quantidades lipídicas, de EROs e GSH nos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro* por técnicas fluorimétricas.
- Determinar e comparar a expressão de mRNA relacionados com metabolismo e homeostase celular nos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro* por RT-qPCR.

4.4.- Objetivos do Estudo 4: “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”

4.4.1.- Objetivo geral

Estudar e comparar a expressão de miRNAs e as vias reguladas por estes entre a produção *in vivo* e *in vitro*.

4.4.2.- Objetivos específicos

- Estudar e comparar a expressão de miRNA e as vias reguladas por estes nas células do cumulus e oócitos provenientes de COCs imaturos e maturado *in vivo* e *in vitro*.
- Estudar e comparar a expressão de miRNAs e as vias reguladas por estes nos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*.

5.- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Como mostrado na Figura 1, neste trabalho foram realizados quatro estudos com diferentes delineamentos. No primeiro estudo, intitulado “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”, foram comparadas células do cumulus e oócitos de COCs imaturos, maturados *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo foram realizadas análises de espectrometria de massas ligada a HPLC nos COCs para quantificar e classificar os lipídeos; quantificações de EROs e GSH por técnicas fluorimétricas para análise da homeostase oocitária; análise da atividade mitocondrial oocitária pela mensuração da razão ATP/ADP por luminometria e análises de expressão gênica de mRNA e miRNAs relacionados com metabolismo e homeostase nos COCs.

No segundo estudo, intitulado “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3* - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”, primeiramente foram comparados os níveis lipídicos e de FABP3 entre COCs de amostras imaturas, maturadas *in vivo* e *in vitro* mediante western blot das proteínas PLIN2 e FABP3 nas células do cumulus, RT-qPCR dos transcritos de *FABP3* no COC e fluorimetria para quantificação lipídica oocitária. Em seguida foram coletados COCs imaturos e com 9 e 18 horas de MIV com intuito de imunolocalizar a FABP3 nas TZPs. Após conferir o comportamento lipídico e da FABP3 ao longo da MIV por fluorimetria e western blot, respectivamente, foi avaliada a necessidade da presença da TZPs para a ocorrência do transporte da FABP3 e ácidos graxos, através do uso da citocalasina B durante as primeiras 9 horas da MIV.

Figura 1. Delineamento experimental do trabalho mostrando a divisão dos quatro estudos executados.

Estudo 1: "A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino "

Estudo 2: "A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3 - FABP3*) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos"

Estudo 3: "Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*"

Estudo 4 : "O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oócitaria e desenvolvimento embrionário inicial em bovino"

No terceiro estudo, "Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*", foram comparados os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Para isso, foram mensuradas as quantidades lipídicas, de EROs e GSH por fluorimetria e mRNA relacionados com metabolismo e homeostase por RT-qPCR.

No último estudo, o número 4, intitulado "O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino", foram analisados o perfil de miRNA e vias reguladas por estes em células do cumulus e oócitos provenientes de COC imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro* e blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

6.- MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.- Animais

Sempre que as amostras foram direcionadas ao estudo do processo *in vivo* e *in vitro*, foram utilizadas sempre fêmeas Nelore como doadoras de oócitos e/ou embriões. Para a coleta de amostras *in vivo*, 33 fêmeas foram mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum*, com sal mineral e água *ad-libitum*. Já a coleta de amostras *in vitro* foram realizadas a partir de oócitos obtidos de ovários de raça Nelore *post-mortem*.

Para os estudos direcionados ao entendimento do papel da FABP3 e TZPs no transporte de ácidos graxos na MIV, foram utilizados oócitos obtidos de ovários de vacas cruzadas obtidas *post-mortem*.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FZEA- USP, Pirassununga, SP, Brasil, com o número 14.1.675.74.7. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, da Sociedade de Estudo da Reprodução (Society for the Study of Reproduction)

6.2.- Coleta de oócitos imaturos e maturados *in vitro* e *in vivo*

Para a obtenção de oócitos imaturos e maturados *in vitro*, COCs de Grau I e II foram coletados por aspiração de folículos de 3 a 8 mm diâmetro de ovários *post-mortem*. Parte dos COCs foram destinados ao estudo de oócitos imaturos. Estes foram desnudados e os oócitos desnudos e as células do cumulus provenientes desses COCs foram estocados para posteriores análises. Os COCs destinados a maturação *in vitro* foram cultivados a 38.5°C e 5% de CO₂ em ar e alta umidade por 24 horas. O meio de MIV foi composto por TCM-199 com sais de Earle, L-glutamina e 2.2 g/L de bicarbonato de sódio (GIBCO BRL), 0.5 µg/mL do hormônio folículo estimulante (FSH; Ourofino Saúde Animal), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor; Ourofino Saúde Animal), 50 µg/mL de gentamicina, 0.2 mM de piruvato de sódio e 10% soro fetal bovino (SFB, GIBCO). Após a maturação, as células do cumulus expandidas de COC foram separados, individualmente, do oócito com ajuda de agulhas, e estocadas a -80°C. Os oócitos foram totalmente desnudados

mediante pipetagens com ponteiros tipo *stripper* de 135 µm de diâmetro. Todos os oócitos foram avaliados para a maturação nuclear e unicamente aqueles que estavam no estágio de metáfase II (MII) com extrusão do primeiro corpúsculo polar (1ºCP) foram utilizados para as análises. Amostras destinadas a análises de RNA foram imediatamente submergidas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até o uso.

Para a coleta de oócitos maturados *in vivo*, a onda folicular ovariana de vacas cíclicas Nelore foi sincronizada e os animais foram submetidos ao protocolo de superovulação folicular como descrito a seguir. No primeiro dia (Dia 0), as vacas receberam 0,5 mg de cloprostenol (Sincrocio, OuroFino Saúde Animal) e a onda folicular foi sincronizada mediante ablação folicular, juntamente com a administração de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal) e à inserção do implante intravaginal de progesterona (Sincrogest, OuroFino Saúde Animal). A superestimulação folicular foi iniciada no Dia 4, administrando-se um total de 133 mg de FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health Canada Inc.) por fêmea em 8 doses decrescentes administradas a cada 12 horas. Concomitante à sexta dose de FSH, foi administrado 0,5 mg de cloprostenol, e 12 horas depois, o implante foi retirado das vacas. No oitavo dia, foi administrado 0,02 mg de acetato de buserelin (análogo de GnRH, Sincroforte, OuroFino Saúde Animal) e 25-26 horas depois os COCs foram coletados mediante aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick-up* – OPU). Os oócitos coletados foram avaliados e unicamente aqueles com presença do 1ºCP e as células do *cumulus* provenientes destes COCs foram utilizadas para análise.

Ao total foram realizadas 12 repetições biológicas das maturações *in vivo* e *in vitro* para a coleta das amostras.

6.3.- Coleta de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*

O sêmen do mesmo touro de raça Nelore foi utilizado para a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões.

6.3.1.- Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE)

A MIV foi realizada como explicado para a coleta de oócitos maturados *in vitro*. Neste caso, os COCs foram destinados a fecundação e cultivo *in vitro* (FIV e CIV).

Depois da MIV dos oócitos e após a descongelação do sêmen (37°C/30 segundos), o mesmo foi depositado em gradiente de Percoll 45% e 90% previamente preparado. Após centrifugação por 7 minutos a 3600xg, o sedimento suspenso foi removido, e então foram adicionados 500µL de meio de fecundação, procedendo-se nova centrifugação por 5 minutos a 520xg. Em seguida, foi corrigida a dose de sêmen para 100×10^3 espermatozoides por microgota de 100 µL, avaliando-se concentração e motilidade espermática, e a mesma foi adicionada nas gotas de fertilização onde os espermatozoides, na presença de heparina, foram capacitados. Os oócitos maduros foram transferidos para as gotas após serem lavados duas vezes em meio TL-Sêmen. O meio de fecundação foi composto por TALP-FIV, 6mg/mL de BSA-FAF, 83,4µg/mL de amicacina e 0,2 mM piruvato de sódio, 10 µg/mL de heparina, 18 mM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de epinefrina, e as gotas cobertas por óleo mineral. As placas foram incubadas para a fecundação por 18 a 20 horas a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Após a FIV, os prováveis zigotos foram transferidos da placa de FIV para uma gota contendo 150 µL de meio TL-Sêmen para a remoção das células do cumulus remanescentes por meio de pipetagens sucessivas. Após a remoção, os mesmos foram separados das células desagregadas e lavados duas a três vezes em meio SOFaaci (fluido sintético de oviduto acrescido de aminoácidos, citrato e inositol). Em seguida, foram distribuídos em gotas de 100 µL contendo meio composto por SOF suplementado com 8mg/mL de BSA, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg/mL de amicacina. As placas foram incubadas em atmosfera controlada de 5% CO₂ e 5% O₂. A troca de meio foi realizada no dia 4 do cultivo, junto com contagem da taxa de clivagem, sendo que o tempo total de cultivo foi de sete dias. A coleta dos blastocistos foi realizada no dia 7 do cultivo.

6.3.2.- Produção *in vivo* de embriões

No caso da produção *in vivo* de embriões, o protocolo de sincronização e superestimulação foi realizado como explicado acima para a coleta de oócitos *in vivo*. Neste caso, as doadoras foram inseminadas após 12 e 24 horas depois do indutor de ovulação, o acetato de buserelin, e a coleta dos embriões realizada sete dias após a primeira IA, no D16, mediante lavagem uterina. Blastocistos foram coletados e armazenados até serem analisados.

6.4.- Estudo 1: “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”.

6.4.1.- Análises de espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em oócitos e células do cumulus.

Para a identificação e quantificação relativa de lipídeos nos oócitos e células do cumulus de COCs imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*, foi realizada a espectrometria de massa acoplada à HPLC. O cromatograma dos lipídeos ionizados está apresentado no Apêndice A. Para cada grupo foram utilizados 5 *pools* de células do cumulus provenientes de 7 COCs ou 5 *pools* de dez oócitos desnudos.

6.4.1.1.- Reagentes químicos

Metanol (MeOH, HPLC grade), clorofórmio (CHCl₃, HPLC), acetonitrila (ACN, HPLC), água (H₂O, ultra-gradient grade) e isopropanol (IPA, HPLC) da JT Baker (Avantor). Os padrões internos para a espectrometria de massas foram obtidos na Avanti Polar Lipids: d₅-Triacylglycerol Internal Standard mixture (20:5-22:6-20:5 TAG-d₅, 14:0-16:1-14:0 TAG-d₅, 15:0-18:1-15:0 TAG-d₅, 17:0-17:1-17:0 TAG-d₅, 19:0-12:0-19:0 TAG-d₅, 20:0-20:1-20:0 TAG-d₅, 20:2-18:2-20:2 TAG-d₅, 20:5-22:6-20:5 TAG-d₅, e 20:4-18:2-20:4 TAG-d₅) e d₅-Diacylglycerol Internal Standard mixture (1,3-20:5 DAG-d₅, 1,3-14:2 DAG-d₅, 1,3-15:0 DAG-d₅, 1,3-16:0 DAG-d₅, 1,3-17:0 DAG-d₅, 1,3-19:0 DAG-d₅, 1,3-20:0 DAG-d₅, 1,3-20:2 DAG-d₅, e 1,3-20:4 DAG-d₅). A coluna de sílica (100 mg para 1 mL) foi adquirida da Phenomenex.

6.4.1.2.-Preparação da solução dos padrões internos

As substâncias foram combinadas a 200 ng/mL para cada padrão em clorofórmio : metanol (1:1, v/v). Antes do uso, a solução foi diluída para 40 ng/mL em ACN.

6.4.1.3.- Extração lipídica das amostras

Em cada pool contendo 10 µL de PBS foram adicionados 150 µL de água, 450 µL IPA e 50 µL da mistura dos padrões (40 ng/mL). Em continuação, os pools foram homogeneizados por vórtex por 1 min, sonicados por 20 min e centrifugados a 15000 g por 5 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, as amostras foram separadas em duas fases: a fase aquosa ao fundo e a fase orgânica encima. A fase orgânica de cada amostra foi secada por corrente de nitrogênio a 45°C. Em cada amostra foram adicionados 2 mL de éter-dietil de petróleo leve (90:10, v/v) que foi limpo com a coluna de extração de fase sólida.

A coluna de estratos de sílica (100 mg) conectada a vácuo foi condicionada com 2 mL de água e 5 mL da fase móvel inicial (éter-dietil de petróleo leve 90:10, v/v). Os lipídeos foram eluídos com 5 mL de uma fração de dietil éter contendo mono-, di e triacilglicerol (MAG, DAG e TAG, respectivamente) (Marquezruiz *et al.*, 1996). A fração foi evaporada com a exposição constante de gás de nitrogênio a 45°C. O extrato lipídico foi diluído com 50 µL de ACN:IPA:H₂O na proporção de 79:5:1 contendo 5 mM de acetato de amônio e vortexado por 3 min. A amostra foi filtrada no filtro de micro centrifuga (membrana de fluoreto de polivinildeno com poros de 0,22 µm) e centrifugada por 5 min (10,000 g), transferido a um tubo com inserto ou para uma placa específica e injetada no sistema HPLC. O conjunto de amostras também continha os controles apropriados para detectar qualquer contaminação. Os lipídeos identificados foram quantificados mediante os correspondentes padrões internos (para MAG foi utilizado o padrão interno de TAG)

6.4.1.4.- Análises.

Os lipídeos foram quantificados utilizando o sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) composto pelo 5500 Q-TRAP[®] mass spectrometer (Sciex) com a interfase ESI e 1260 series[®] HPLC Agilent (Agilent). A aquisição e análises dos dados foi realizada utilizando o software Analyst[®] (version 1.6.1; Sciex). Lipídeos marcados (deuterados) e não marcados foram separados pela coluna Phenomenex C8 (3.0 × 150 mm, 2.7 µm, Phenomenex) com a pré-coluna compatível a 45°C com o gradiente linear da fase móvel B (acetonitrila: isopropanol 80:20, v/v) para a fase móvel A (50% acetonitrila em água contendo 5 mM de acetato de amônio) com o fluxo de 300 µL/min.

A fase B móvel foi incrementada linearmente de 1 a 99% por 5 min, mantida constante por 20 min, retornada para condição inicial por 1 min, e mantida constante por mais 5 min antes da próxima injeção.

Para análises, 5 µL de cada amostra foram injetados dentro da coluna LC. Lipídeos marcados e não marcados foram detectados por espectrometria de massas com a interface ESI operando no modo íon positivo (voltagem de capilaridade, 5 kV; cortina de gás 10 psi; gás nebulizador 45 psi; gás de dessolvatação 20 psi; gás CAD 12 psi (sempre N₂); a 450 °C)

O modo de monitoramento de múltipla reação (MRM) foi utilizado para a detecção MS/MS, e os parâmetros foram otimizados para cada lipídeo da solução sintética de lipídeos marcados. As transmissões MRM selecionados, cone de voltagem, ou potencial de desclusterização, energia de colisão, e potencial de saída de célula de colisão, e o tempo de retenção estão descritos no Apêndice B

6.4.2.- Quantificação da glutathiona reduzida (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROs) por fluorimetria em oócitos imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*.

Oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* foram analisados para quantificação de GSH e EROs mediante sondas no microscópio confocal. Para isso, como as amostras têm que ser coradas antes de ser fixadas, a coleta dos oócitos foi

sincronizada para poder corar os oócitos de todos os grupos ao mesmo tempo. Trinta e sete oócitos imaturos, 29 maturados *in vivo* e 24 *in vitro* foram corados com 5 μM de CellRoX Green (Molecular Probes) e 10 μM de Celltracker Blue CMF2HC (Molecular Probes) por 30 min para cada sonda. Em continuação, todos os oócitos foram fixados com 4% de paraformaldeído por 30 min e colocados entre lâmina e lamínula na solução Fluoromount Reagent. Os oócitos foram analisados no confocal LSM 710 (Carl Zeiss) utilizando-se a objetiva de 63X com óleo e o laser de Argônio (488 nm) e o Diodo (405 nm) com a excitação e emissão ajustada para cada sonda. Todas as imagens foram capturadas utilizando os mesmos parâmetros, numa aquisição sequencial. Foram capturadas três imagens de cada oócito: uma no meio do oócito e as outras duas no meio das metades resultantes. As imagens foram analisadas para quantificação de GSH e EROs pela intensidade de fluorescência (f.i) mediante o software ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde o software atribui valores de intensidade entre 0 e 255 para cada pixel.

6.4.3.- Quantificação do ATP, ADP e ATP/ADP por luminometria em oócitos imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*

A quantificação de ATP e ADP e a razão ATP/ADP foi realizada em 30 oócitos individuais por grupo utilizando-se o kit de bioluminescência ApoSENSOR ATP Assay Kit (BioVision) seguindo as instruções do fabricante, sendo que este kit mede os valores de absorbância de ATP. Primeiro foi medida a absorbância do ATP nas amostras mediante análises de luminescência. Em seguida, mediante reação enzimática, o ADP foi convertido em ATP e a absorbância foi medida novamente. Os valores de ADP foram calculados a partir da diferença entre a primeira e segunda mensuração de absorbância. Os valores absolutos de ATP foram calculados utilizando uma curva padrão de ATP (0,15, 0,075, 0,0375, 0,01875 e 0,009375 μM) e, a partir destes valores, foram estimados os valores de ADP e a razão ATP/ADP.

6.4.4.- Extração do RNA total.

Para a extração do RNA total, foram utilizados 5 pools de 20 oócitos desnudos imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro* e oito pools de células do cumulus provenientes de 20 COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. Depois do isolamento do RNA

mediante o TRIzol, este foi misturado com 100% de etanol e a extração foi continuado utilizando o kit comercial miRNeasy kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A concentração RNA foi mensurada no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e a qualidade foi avaliada pela razão 260/280.

6.4.5.- Transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA).

A transcrição reversa do mRNA foi realizado utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Aproximadamente 10ng do RNA total por gene alvo foi cultivado com 10X RT buffer, 25X dNTP mix (100 mM), 10X RT primer randômico e água nuclease-free a 25°C por 10 min e 37°C por 120 min seguido de 5 min a 85°C. No caso do miRNA, foi utilizado o kit miScript Polymerase Chain Reaction (PCR) System (Qiagen #218193), seguindo as instruções do fabricante. 100 ng do RNA total foi incubado com 5X miScript HiFlex buffer, 10X miScript nucleic acids mix, água RNase-free, e miScript Reverse Transcriptase a 37°C por 60 min seguido de 5 min a 95°C.

6.4.6.- qPCR em tempo real (RT-qPCR) para análises de expressão de genes relacionados com metabolismo e homeostase celular em oócitos e células do cumulus imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*.

Para análise de expressão nos realizamos análises de microfluídica dos níveis de transcritos de 25 genes relacionados com metabolismo e estresse celular (Tabela 1) utilizando Biomark HD System (Fluidigm). Para isso foram utilizados os genes *PPIA*, *GAPDH* e *ACTB* como genes endógenos. A expressão gênica por microfluídica foi realizada utilizando ensaios TaqMan (20X, Applied Biosystems) específicos para *Bos taurus*. Para cada amostra, a pré-amplificação foi realizada com 1,25 µL de cDNA numa concentração de 5 ng/µL que foi cultivado com 1,25 µL do mix do ensaio (o ensaio Taqman foi ajustado para uma concentração final de 0.2X para cada 24 ensaios) e 2,5 µL TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) a 95°C por 10 min, 95°C por 15 seg, e 60°C por 4 min por 14 ciclos. Depois de ser diluído 5 vezes, os produtos das pré-amplificações foram analisados por PCR quantitativo a tempo real (Rt-qPCR) utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e ensaios TaqMan (20X, Applied Biosystems) no 96.96 Dynamic Array

Integrated Fluidic Circuits em Biomark HD System (Fluidigm) usando o protocolo TaqMan GE 96 × 96 Standard, de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1. Símbolo dos genes, função e identificação (ID) dos ensaios usados na análise de expressão por microfluídica (Biomark HD System – Fluidigm)

Símbolo do gene	Função	ID do ensaio*
ACACA	Síntese de AG	Bt03213389_m1
FASN	Síntese de AG	Bt03210485_m1
SCD	Desaturação de AG	Bt04307476_m1
FADS2	Desaturação de AG	Bt03256253_g1
ACSL3	Elongação de AG	Bt04282144_g1
ACSL6	Elongação de AG	Bt03231692_m1
ELOVL6	Elongação de AG	Bt00907566_m1
G6PD	Metabolismo da glicose	Bt03649181_m1
PFKP	Metabolismo da glicose	Bt04316544_m1
PGK1	Metabolismo da glicose	Bt03225857_m1
ATF4	Estresse do RE e apoptose	Bt03221057_m1
BAX	Estresse do RE e apoptose	Bt03211776_m1
BCL2	Estresse do RE e apoptose	Bt04298952_m1
GRP78	Estresse do RE e apoptose	Bt03244880_m1
CASP3	Estresse do RE e apoptose	Bt03250956_g1
CASP9	Estresse do RE e apoptose	Bt04282453_m1
NRF2	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03251880_m1
KEAP1	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03817661_m1
SOD1	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03215423_g1
SOD2	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03244551_m1
GPX1	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03259217_g1
GPX4	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03259611_m1
PRDX1	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03223684_m1
CAT	Resposta ao estresse oxidativo e do RE	Bt03228714_m1
PPIA	endógeno	Bt03224615_g1
GAPDH	endógeno	Bt03210913_g1
ACTB	endógeno	Bt03279174_g1

* ThermoFischer Scientific; AG = ácido graxo; RE = retículo endoplasmático

Com intuito de completar este trabalho, foi realizada RtTqPCR de vários genes relacionados com síntese e acúmulo lipídico (*PLIN2*, *PLIN3* e *SREBP1*), β -oxidação (*CPT1A*, *CPT1B* e *CPT2*) e estresse do retículo endoplasmático (*CHOP10*, *IRE*, *PERK* e *ATF6*), utilizando-se como genes endógenos o *PPIA*, *SDHA*, e *YWAHZ* de acordo com Macabelli *et al.* (2014)

Para análise dos níveis de transcritos os *primers* foram desenhados com base as sequências disponíveis no GenBank (Tabela 2). Estes primers foram testados para

eficiência e os *amplicons* obtidos foram sequenciados para avaliar sua especificidade. As reações do RT-qPCR foram realizadas utilizando 10ng de cDNA para cada gene e 74 nM de cada *primers* utilizando-se o Power SYBR® Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems) no QuantStudio 6 Flex PCR System (Applied Biosystems). As condições utilizadas nas reações de PCR foram de 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 60 s, seguido de análises das curvas de dissociação para confirmar um único produto de cDNA.

Tabela 2. Sequência dos *primers*, tamanho do *amplicon* e número de acesso dos *primers* usados para RT-qPCR nos oócitos e células do *cumulus*.

Símbolo do gene	Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do amplicon (bp)	Acesso #
PLIN2	PLIN2 F	TGCACTCACCAAATCAGAGC	206	NM_173980.2
	PLIN2 R	GCAGCTTGGTGGACAGAGAT		
PLIN3	PLIN3 F	GATCGCGTGCGTGCTTCTGA	136	NM_001077046.1
	PLIN3 R	GTGGAGCTGATGAGGGGCAT		
SREBP1	SREBP1 F	TGCTGACCGACATAGAAGACAT	81	NM_001113302.1
	SREBP1 R	CGTAGGGCGGGTCAATAG		
CPT1A	CPT1A F	TACCGACTCACATCCAGGCG	129	FJ415874.1
	CPT1A R	CGGAGCAGAGCGGAATCGTA		
CPT1B	CPT1B F	GGATGAGGAGTCTCACCCTATG	133	NM_001034349.2
	CPT1B R	GCCGTTCTTGAAAGAGATGAGTG		
CPT2	CPT2 F	TCGTGCCCCACTATGCACTACC	126	NM_001045889.2
	CPT2 R	CTGTTTTCTGAACTGGCTGTCA		
CHOP10	CHOP10 F	CAAAGCCGGAACCTGAGGAGA	79	NM_001078163.1
	CHOP10 R	TCAGGCTCTGCTTTCAGGTGTG		
IRE1	IRE1 F	ATGAGGAGACCGGCATGGTG	101	XM_010824247.1
	IRE1 R	AAACATGCCCCGGTACACGA		
PERK	PERK F	CCCGTTTCGGCACTCAAATGG	108	NM_001098086.1
	PERK R	TGCACCATGGCATACTCACGA		
ATF6	ATF6 F	AGAGGAGCAAGACACATCGG	95	XM_003585816.2
	ATF6 R	CAGTTAGCACCATCAGGGCT		
YWHAZ	YWHAZ F	GCATCCCACAGACTATTTCC	120	GU817014.1
	YWHAZ R	GCAAAGACAATGACAGACCA		
SDHA	SDHA F	AACCTGATGCTTTGTGCTCTGC	101	NM_174178.2
	SDHA R	TCGTCAACCCTCTCCTTGAAGT		
PPIA	PPIA F	CATACAGGTCCTGGCATC	108	NM_178320.2
	PPIA R	CACGTGCTTGCCATCCAA		

6.4.7.- RT-qPCR para análises de expressão de miRNAs preditos que regulam genes relacionados com metabolismo e homeostase celular em oócitos e células do cumulus imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*.

Com intuito de avaliar se os miRNA preditos que regulam os genes do nosso estudo foram alterados após a MIV, os miRNA foram identificados mediante bioinformática. A expressão relativa de 88 miRNA maduros bovinos (Tabela 3) foram avaliados nos oócitos e células do cumulus imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*. Para isso, os miRNA foram escolhidos baseado no fato de estarem validados ou pela interação predita com os genes alvo (Apêndice C), utilizando três critérios para esse objetivo. Primeiro, foram escolhidos miRNA validados para genes bovinos mediante a ferramenta miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>). Quando não existia validação em bovino mas existia em humano, foram comparados a homologia entre os miRNAs bovinos e humanos mediante o miRBase (<http://mirbase.com>, Apêndice D) e seus sítios de ligação mediante a ferramenta TargetScan (www.targetscan.org). Finalmente, quando não havia validação, foram escolhidos miRNAs preditos que regulam os genes alvo mediante TargetScan.

As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µL contendo 2X Quantitec SYBR Green (Qiagen), 10 µM do *primer* reverso Universal (Qiagen), 10 µM do primer forward específico para miRNA (Apêndice E), e 0.03 µL do cDNA diluído 1:4. As reações foram analisadas utilizando-se o QuantStudio 6 Flex PCR System. O programa utilizado para as reações foi: 95°C por 5 min e 45 ciclos de 95°C por 10 s, 55°C por 15 s e 72°C por 15 s e a amplificação foi confirmada mediante análises da curva de dissociação. Os valores de Ct foram normalizados usando a média geométrica de *RNU43* snoRNA, Hm/Ms/Rt U1 snRNA, e bta-miR-99b. A expressão foi calculada usando o método de $2^{-\Delta Ct}$.

Tabela 3. miRNA bovinos amplificados em este estudo e seus respectivos genes alvos.

miRNAs	Genes alvo	miRNAs	Genes alvo
bta-let-7a-5p	<i>CASP3</i>	bta-miR-146a	<i>PGK1</i>
bta-miR-15a	<i>ACSL6, BCL2</i>	bta-miR-146b	<i>PGK1</i>
bta-miR-15b	<i>FASN, ACSL6, BCL2</i>	bta-miR-149-5p	<i>ATF6</i>
bta-miR-16a	<i>ACSL6, BCL2</i>	bta-miR-153	<i>NRF2</i>
bta-miR-16b	<i>FASN, ACSL6, BCL2</i>	bta-miR-181a	<i>SCD, ACSL6, CPT1A, BCL2</i>
bta-miR-17-5p	<i>PFKP, CASP9</i>	bta-miR-181b	<i>ACSL6, CPT1A, BCL2, GRP78</i>
bta-miR-20a	<i>PFKP, CASP9</i>	bta-miR-181c	<i>ACSL6, CPT1A, BCL2</i>
bta-miR-20b	<i>PFKP, CASP9</i>	bta-miR-181d	<i>ACSL6, CPT1A, BCL2</i>
bta-miR-23a	<i>ACSL3</i>	bta-miR-182	<i>BCL2</i>
bta-miR-23b-3p	<i>ACSL3</i>	bta-miR-186	<i>ACSL6, CASP6</i>
bta-miR-24-3p	<i>ACSL6</i>	bta-miR-195	<i>ACSL6, BCL2</i>
bta-miR-25	<i>ATF6</i>	bta-miR-199a-3p	<i>ATF6</i>
bta-miR-26a	<i>ACSL3</i>	bta-miR-199a-5p	<i>IRE1, ATF6, GRP78</i>
bta-miR-26b	<i>ACSL3</i>	bta-miR-200b	<i>ACSL3</i>
bta-miR-27a-3p	<i>NRF2</i>	bta-miR-200c	<i>ACSL3</i>
bta-miR-29b	<i>BAX</i>	bta-miR-202	<i>ACSL3</i>
bta-miR-29c	<i>BAX</i>	bta-miR-204	<i>ELOVL6, BCL2</i>
bta-miR-29d-3p	<i>BAX</i>	bta-miR-206	<i>G6PD</i>
bta-miR-30a-5p	<i>GRP78</i>	bta-miR-211	<i>ELOVL6, BCL2</i>
bta-miR-30b-5p	<i>CAT</i>	bta-miR-218	<i>ACSL6</i>
bta-miR-30c	<i>CASP3</i>	bta-miR-223	<i>ACSL3</i>
bta-miR-30d	<i>CASP3</i>	bta-miR-302b	<i>PFKP</i>
bta-miR-32	<i>ATF6</i>	bta-miR-302c	<i>PFKP</i>
bta-miR-33a	<i>SREBP1, CPT1A</i>	bta-miR-302d	<i>PFKP</i>
bta-miR-33b	<i>CPT1A</i>	bta-miR-330	<i>ACSL6, SOD2</i>
bta-miR-34a	<i>BCL2</i>	bta-miR-346	<i>CASP9</i>
bta-miR-34b	<i>BCL2</i>	bta-miR-365-3p	<i>PGK1, BCL2</i>
bta-miR-34c	<i>BCL2</i>	bta-miR-374a	<i>ACSL6</i>
bta-miR-92a	<i>ATF6</i>	bta-miR-374b	<i>ACSL6</i>
bta-miR-92b	<i>ATF6</i>	bta-miR-378	<i>ATF6</i>
bta-miR-93	<i>PFKP, CASP9</i>	bta-miR-381	<i>ACSL3</i>
bta-miR-96	<i>CHOP10</i>	bta-miR-421	<i>ACSL3</i>
bta-miR-106a	<i>PFKP, CASP9</i>	bta-miR-424-5p	<i>ACSL6</i>
bta-miR-106b	<i>PFKP, CASP9</i>	bta-miR-429	<i>ACSL3, CPT2</i>
bta-miR-124a	<i>CPT1A</i>	bta-miR-448	<i>ACSL6</i>
bta-miR-124b	<i>CPT1A</i>	bta-miR-449a	<i>BLC2</i>
bta-miR-125a	<i>ATF6</i>	bta-miR-495	<i>ACSL6, PGK1</i>
bta-miR-125b	<i>BCL2</i>	bta-miR-497	<i>ACSL6, BCL2</i>
bta-miR-132	<i>ACSL3</i>	bta-miR-499	<i>CPT1A</i>
bta-miR-136	<i>SOD2</i>	bta-miR-503-5p	<i>ACSL6, ATF6</i>
bta-miR-137	<i>ACSL6</i>	bta-miR-582	<i>ACSL6</i>
bta-miR-142-5p	<i>ACSL6, CASP9, NRF2</i>	bta-miR-670	<i>ATF6</i>
bta-miR-143	<i>PGK1, BCL2</i>	bta-miR-873	<i>PGK1, GPX1</i>
bta-miR-144	<i>NRF2</i>	bta-miR-875	<i>ATF6</i>

6.4.8.- Análises da metilação do DNA da região promotora do gene *CPT1A* nas células do cumulus por sequenciamento bissulfito

Para determinar se a diferença de expressão entre as isoformas de CPT1, CPT1A e CPT1B, nas células do cumulus da MIV deve-se a diferenças de metilação do DNA entre amostra de maturação *in vivo* e *in vitro*, análises de metilação de DNA foram realizadas em 11 sítios CpG na região flangeadora 5' do gene CPT1A. Para as análises de metilação foram usados 800 ng do DNA genômico dos mesmos pools utilizados para análises de RNA dos grupos imaturos, *in vivo* e *in vitro*. O DNA foi convertido utilizando-se o kit EpiTect Bisulfite (Qiagen). Foram desenhados *primers* específicos para DNA convertido no bissulfito (CPT1A-F 5' TTTTGATTTTGATGGGTTTGA 3' e CPT1A-R 5' AACCAAATAAAACCCCAAACTATA 3') para amplificar 411 nucleotídeos que cobriam o fragmento de -1633 a -1222 bp da região promotora (Ensembl accession no. ENSBTAG00000021999) usando o *Methyl Primer Express Software* v1.0 (Applied Biosystems). As reações de PCR foram compostas de um total de 25 µL contendo 10–50 ng do DNA, 1X de DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific), 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer*, 1,25 U de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) e água ultrapura MilliQ. O programa de amplificação foi de 50 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C e 30 s a 72°C, precedidos pela etapa de desnaturação de 3 min a 94°C e seguido da etapa final de extensão de 3 min a 72°C. Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese no gel de 1,5% agarose e purificado usando o QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). Os produtos purificados foram clonados no plasmídeo pGEM-T Easy Vector (Promega) e transformados dentro de bactérias competentes *Escherichia coli* DH5α. Os plasmídeos recombinantes foram recuperados usando o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Para assegurar a confiabilidade da porcentagem de metilação das CpGs, foram selecionadas e sequenciados de 10 a 16 clones de cada amostra.

6.4.9.- Análises estatísticas

A quantidade lipídica e os níveis de ATP e ADP foram comparadas usando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Para as

quantidades de GSH, EROs, MAG, DAG, e TAG e para análise de expressão de mRNA e miRNA, os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Tukey. A homogeneidade das variâncias foi testadas utilizando-se o teste Levene e a normalidade foi mensurada com o teste Shapiro-Wilk. Todas as análises foram realizadas no software SAS (SAS Institute Inc.) e o nível de significância foi considerada 5% para todos os testes.

6.5.- Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3* - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”.

6.5.1.- Quantificação lipídica e de níveis de FABP3 durante a maturação *in vivo* e MIV

6.5.1.1.- Quantificação lipídica dos oócitos por técnica fluorimétrica.

A quantificação lipídica foi realizada mediante a marcação das gotas lipídicas com a sonda específica para lipídeos neutros, BODIPY 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), seguindo as instruções do fabricante. Quarenta e nove oócitos imaturos, 46 maturados *in vivo* e 45 *in vitro* foram coletados e analisados. Oócitos desnudos foram fixados com 4% de paraformaldeído por 30 minutos, permeabilizados com 0,1% de saponina em PBS por uma hora e corados com 20 µg/mL de BODIPY 493/503 por 30 minutos. Os oócitos foram analisados usando o microscópio confocal LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) numa magnitude de 63X em óleo excitados com o laser Argônio 488. Foi capturada uma imagem por oócito usando a seção de maior diâmetro e analisado usando o ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A razão da área das gotas lipídicas/ área total do oócito foi realizada como descrito anteriormente (Del Collado *et al.*, 2016). Brevemente, para obter a área que das gotas lipídicas utilizamos a ferramenta “*nucleus counter*” que permite o cálculo total da área ocupada pelas gotas. Em continuação, foi medida a área do oócito para o cálculo da razão área das gotas lipídicas/área do oócito.

6.5.1.2.- Quantificação da PLIN2 e FABP3 por western blot nas células do cumulus.

Para a quantificação das proteínas PLIN2 e FABP3 nas células do cumulus de COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* foi realizada a técnica de western blot. A proteína usada para esta técnica foi isolada dos mesmos pools utilizados para a expressão gênica do Estudo 1 após a extração do RNA utilizando TRIzol. A proteína foi isolada a partir da fase orgânica como indicado pelo fabricante.

Devido à baixa quantidade proteína recuperada, os pools de cada grupo foram agrupados e analisados em três repetições técnicas. A quantidade de proteína das amostras foi mensurada com o kit Qubit Protein Assay Kit (Molecular Probes) no Qubit Fluorimetric Quantitation (Thermo Fisher Scientific). O total de 50µg de proteína foi colocado no gel comercial de 10%-SDS- PAGE, Mini-Protean TGX Gels (456-1033, Bio-RAD, Hercules, CA, USA). A eletroforese foi realizada a 100 V por 70 min, e a proteína foi transferida na membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF) usando o Trans-Blot Turbo Transfer Pack (170-4156, Bio-RAD) no aparelho de transferência semi-seco, Trans-Blot Turbo, usando o programa “mini TGX program” (3 min a 25 V constantes). Em continuação, as membranas foram bloqueadas com 5% de BSA em buffer salina tris com tween (TBST) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram cultivadas *overnight* com o anticorpo primário PLIN 2 anti-ADRP de coelho (1:2000, SC32888, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) a 4°C. Depois da incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBST por 5 minutos cada uma e incubado no anticorpo secundário, anti-coelho conjugado com HRP (1:2000, A0545, Sigma), por 1 hora a temperatura ambiente. Para detecção da FABP3 foi usado o anticorpo primário anti-cardiac-FABP de coelho (1:2000, AB45966, Abcam) e o secundário anti-coelho conjugado com HRP (1:4000; A0545, Sigma). As membranas foram lavadas mais três vezes com 1 x TBST por 5 min.

Para detecção, as membranas foram submetidas a reação de quimiluminescência utilizando o kit ECL Plus Prime Western Blotting Detection System (Amersham™, Buckinghamshire, UK).

As análises da densidade de banda foram realizadas no ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad,) utilizando o software Image Lab 5.1. A quantidade relativa da PLIN2 foi normalizada utilizando o anticorpo anti-histona H3 de coelho (1:2000,

H0164, Sigma) colocada na mesma membrana. No caso da quantificação da FABP3 foram utilizados os anticorpos anti- α -Tubulina de camundongo (1:2000, T9026, Sigma) e o anti-camundongo (1:2000, #70765, Cell Signaling) como endógenos.

6.5.1.3.- Análises de expressão da FABP3 nas células do cumulus e oócitos.

A extração do RNA e síntese de cDNA foi realizado dos mesmos pools e como explicado no Estudo 1. O protocolo de RT-qPCR e os endógenos usados também foram os mesmos. Neste caso os *primers* para a *FABP3* (Tabela 4) foram desenhados a partir das sequências do GenBank e validados como explicado no Estudo 1.

Tabela 4. Sequência dos *primers*, tamanho do *amplicon* e número de acesso dos *primers* da FABP3 usados para RT-qPCR nos oócitos e células do *cumulus*.

Gene	Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do amplicon	#Acesso
FABP3	FABP3 F	AAGTCAAGTCCATCGTGACGC	134	NM_174313.2
	FABP3 R	AACTGCAGTGCCATGGGTGA		

6.5.2.- Imunolocalização da FABP3 nas TZPs e quantificação da FABP3 e lipídeo nos oócitos durante a MIV.

6.5.2.1.- Imunolocalização da FABP3 dentro das TZPs nos COCs durante a MIV.

A FABP3 foi detectada nas TZPs mediante análises de imunofluorescência onde os filamentos de actina das TZPs foram coradas para visualizá-las. Para verificar a presença das FABP3 nas TZPs ao longo da MIV, foram analisados COCs imaturos (n=12), maturados *in vitro* com 9 horas (n=12) e com 18 horas (n=18). Além disso, com intuito de verificar que a presença da FABP3 na zona pelúcida é dependente de TZPs, foram analisados oócitos desnudos (n=10) e parcialmente desnudos (n=10) maturados *in vitro* por 9 horas. Todas as amostras foram obtidas de mais de três replicatas biológicas. Os oócitos foram fixados com 4% de paraformaldeído diluído em PBS com 0,1% de polivinilpirrolidona (PBS-PVP) por 12 minutos. Em continuação, os oócitos foram permeabilizados por 20 minutos numa solução 1% Triton X-100. Após o bloqueio de sítios de ligação não específicos com 5% de BSA por uma hora,

os oócitos foram cultivados *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-FABP3 de coelho (1:200, SC15974R, Santa Cruz Biotechnology) e 1% BSA em PBS. As amostras foram lavadas com PBS-PVP e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa 488 (A11008, Life Technologies, Thermo Fisher) diluído a 1:200. Depois da incubação, as amostras foram lavadas com PBS-PVP por 10 vezes para remover as ligações inespecíficas do anticorpo secundário. Para marcar as TZPs, as amostras foram coradas com 165 nM de Alexa Fluor 647 faloidina (A22287, Life Technologies, Thermo Fisher), um corante de filamentos de actina, por 30 min. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula utilizando Prolong Antifade com DAPI (Life Technologies, Thermo Fisher). Para a captura das imagens foi utilizado o microscópio confocal SP5 (Leica, Wetzlar, Germany), utilizando-se os lasers Argônio 488 nm e HeNe 633 nm e o Diodo 405 nm ajustadas para cada fluoróforo. Todas as imagens foram capturadas em aquisição sequências, na objetiva 63X em óleo e com zoom de 3.5x. Para o controle negativo, omitimos a incubação do anticorpo primário e as amostras foram expostas a potência máxima do laser.

6.5.2.2.- Quantificação lipídica nos oócitos.

Para avaliar a possível relação entre o transporte de FABP3 e o acúmulo lipídico no oócito, nos estudamos o acúmulo lipídico em oócitos imaturos e após 9 e 18 horas da maturação. Foram avaliados um total de 27 oócitos imaturos, 31 oócitos após 9 horas de MIV e 28 oócitos após 18 horas de MIV. A quantificação lipídica foi realizada como explicado na seção 6.5.1.1.

6.5.2.3.- Quantificação da FABP3 por western blot em oócitos.

As análises de western blot em oócitos foram realizadas com 5 pools de 50 oócitos desnudos de cada grupo. Os pools foram diretamente lisados com 7,5µL do buffer RIPA, misturados com 2.5 µL do buffer Laemmli (4x) e fervido a 98 °C por 5 min. Em continuação as amostras foram colocadas no gel SDS-PAGE e os próximos passos foram realizados como explicado na seção 6.5.1.2.

6.5.3.- Remoção das TZPs durante a MIV mediante citocalasina-B.

Com intuito de investigar o efeito do bloqueio das TZPs no acúmulo lipídico, nós removemos as TZPs durante as primeiras 9 horas da MIV suplementando o meio de maturação com 15,7 μ M citocalasina-B. A citocalasina-B é uma potente toxina fúngica que inibe a polimerização da actina, desse modo desestruturando as TZPs.

Primeiramente realizamos a imunodeteção da FABP3 nas TZPs de 10 COCs por grupo (grupo controle (Controle) e grupo com citocalasina (tratado) como explicado na seção 6.5.2.1 para verificar que não existe FABP3 na zona pelúcida sem TZPs. Depois de verificar a remoção das TZPs com o tratamento de citocalasina-B, foi quantificado o conteúdo lipídico de oócitos do grupo controle (n=31) e tratada (n=31) como explicado anteriormente (seção 6.5.1.1.)

6.5.4.- Análises estatísticas.

Os dados de expressão foram analisados utilizando-se ANOVA e as médias foram comparadas mediante o teste de Tukey. Os dados de western blot foram submetidos a transformação logarítmica antes de realizar-se a ANOVA e teste Tukey. Para a quantificação lipídica foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn. O nível de significância foi considerado 5% para todos os testes.

6.6.- Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*”

6.6.1.- Quantificação de EROs e GSH nos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*.

A quantificação de EROs e GSH dos embriões *in vivo* (n=18) e *in vitro* (n=28) foi realizada como indicado na seção 6.4.2 com a exceção de que desta vez foi capturada apenas uma imagem de cada embrião, no ponto de maior diâmetro.

6.6.2- Quantificação de lipídeos nos embriões de PIV e *in vivo*.

O total de 38 embriões produzidos *in vitro* e 28 *in vivo* foram destinados à quantificação lipídica como descrito na seção 6.5.1.1. Neste caso foi calculada a razão da área das gotas lipídicas pela área do embrião e pelo número de blastômeros. Para contar o número de células os embriões foram corados com 10 µg/mL Hoechst 33342 por 20 minutos e posteriormente colocados entre lâmina e lamínula.

6.6.3.- Análise de expressão de genes relacionados com metabolismo e homeostase celular

Para a extração do RNA total, foram utilizados 5 pools de 5 embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. A extração do RNA e a síntese de cDNA foi realizada como explicado no Estudo 1 (6.4.4 e 6.4.5). A expressão de RNAm foi realizada utilizando sistema de microfluídica (Biomark HD System - Fluidigm) para determinar a expressão dos genes das vias de metabolismo lipídico (*ACACA*, *ACSL3*, *ACSL6*, *ELOVL6*, *FADS2*, *FASN*, *LIPE*, *PPARA*, *PPARG*, *SCD*, *SREBP1* e *SREBP2*), estresse celular (*ATF4*, *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP9*, *HSF1*, *HSP90AA1*, *HSPA1A*, *HSPD1*, *GRP78* e *XBP1*) e resposta ao estresse (*CAT*, *FOXO3*, *GPX1*, *GPX4*, *GLRX2*, *KEAP1*, *NRF2*, *PRDX1*, *PRDX3*, *SOD1* e *SOD2*) (Tabela 5). Para estas análises foram utilizados como controle endógeno o gene *PPIA* e a metodologia utilizada foi a descrito no Estudo 1 (6.4.6). As análises de expressão foram completadas realizando-se o RT-qPCR dos genes relacionado com lipídeo *FABP3*, *PLIN2* e *PLIN3*, com aqueles relacionados com a beta-oxidação como o *CPT1A* e *CPT2* e alguns dos genes mais importantes do estresse do RE (*CHOP10*, *PERK*, *IRE1* e *ATF6*), utilizando-se como endógenos os genes *RPL15*, *ACTB* e *PPIA*. A metodologia e *primers* utilizados estão descritos no Estudo 1 (6.4.6)

Tabela 5. Símbolo, função e ID do ensaio dos genes utilizados na microfluídica nos embriões.

Símbolo do gene	Função	ID do ensaio*
ACACA	Metabolismo lipídico	Bt03213389_m1
ACSL3	Metabolismo lipídico	Bt04282144_g1
ACSL6	Metabolismo lipídico	Bt03231692_m1
ELOVL6	Metabolismo lipídico	Bt00907566_m1
FADS2	Metabolismo lipídico	Bt03256255_g1
FASN	Metabolismo lipídico	Bt03210485_m1
LIPE	Metabolismo lipídico	Bt03253691_m1
PPARA	Metabolismo lipídico	Bt03220821_m1
PPARG	Metabolismo lipídico	Bt03217547_m1
SCD	Metabolismo lipídico	Bt04307476_m1
SREBP1	Metabolismo lipídico	Bt03276370_m1
SREBP2	Metabolismo lipídico	Bt04283467_m1
ATF4	Estresse celular	Bt03221057_m1
BAX	Estresse celular	Bt03211777_g1
BCL2	Estresse celular	Bt04298952_m1
CASP3	Estresse celular	Bt03250954_g1
CASP9	Estresse celular	Bt04282453_m1
HSF1	Estresse celular	Bt03249686_m1
HSP90AA1	Estresse celular	Bt03218068_g1
HSPA1A	Estresse celular	Bt03292670_g1
HSPD1	Estresse celular	Bt04301470_g1
GRP78	Estresse celular	Bt03244880_m1
XP1	Estresse celular	Bt03227621_g1
CAT	Resposta ao estresse	Bt03228713_m1
FOXO3	Resposta ao estresse	Bt03649334_s1
GPX1	Resposta ao estresse	Bt03259217_g1
GPX4	Resposta ao estresse	Bt03259611_m1
GRLX2	Resposta ao estresse	Bt03229700_m1
KEAP1	Resposta ao estresse	Bt03817661_m1
NRF2	Resposta ao estresse	Bt03272789_g1
PRDX1	Resposta ao estresse	Bt03223684_m1
PRDX3	Resposta ao estresse	Bt03214402_m1
SOD1	Resposta ao estresse	Bt03215423_g1
SOD2	Resposta ao estresse	Bt03244551_m1

6.7.- Estudo 4: “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oócitaria e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”

6.7.1.- Estudo do perfil de miRNAs nos oócitos e células do cumulus de COCs imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*.

6.7.1.1- Extração do miRNA e síntese de cDNA.

Para este estudo foram utilizados 3 pools de oócitos desnudos e células do cumulus provenientes de COC imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro* obtidos no Estudo 1. A extração de RNA e síntese de cDNA foi realizado como explicado nas seções 6.4.4 e 6.4.5

6.7.1.2.- Expressão gênica dos miRNAs

A expressão de 260 miRNAs foram realizados seguindo a mesma metodologia que no Estudo 1 (6.4.7). Os primers forward utilizados estão listados no Apêndice F.

6.7.1.3.- Análises dos dados

Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Tukey. A homogeneidade das variâncias foi testada utilizando-se o teste Levene e a normalidade foi mensurada com o teste Shapiro-Wilk. O nível de significância foi considerado 5% para todos os testes.

6.7.1.4.- Enriquecimento das vias reguladas pelos miRNAs estudados

Os miRNAs foram agrupados pelo comportamento (exclusivos de um grupo ou estatisticamente diferentes entre grupos) e foi realizado o enriquecimento das vias reguladas por estes. Uma vez que o software para este fim não está disponível para a espécie bovina e sim para a humana, primeiramente foi calculada a similaridade entre miRNAs destas espécies (Apêndice G) utilizado-se a base de dados mirBase (<http://www.mirbase.org>). Em continuação, foi utilizado o software mirPath v.3 da ferramenta DIANA TOOLS para identificação das vias relacionadas aos miRNAs de cada grupo.

6.7.2.- Estudos do perfil de miRNA nos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

6.7.2.1.- Extração de miRNA e síntese de cDNA.

Três *pools* de blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro* obtidos no Estudo 3 foram utilizados. A extração de RNA e síntese de cDNA foi realizado como explicado nas seções 6.4.4 e 6.4.5 do Estudo 1.

6.7.2.2.- Expressão relativa dos miRNAs bovinos.

A expressão dos 380 miRNAs bovinos foi realizado seguindo a mesma metodologia que no Estudo 1 (6.4.7). Os *primers forward* utilizados estão listados no Apêndice H.

6.7.2.3.- Análises dos dados.

A análises dos dados foi realizado como explicado para os oócitos e células do cumulus (6.7.1.3).

6.7.2.4.- Enriquecimento das vias reguladas pelos miRNAs estudados.

O enriquecimento das vias foi realizado como explicado para os oócitos e células do cumulus (6.7.1.4).

7.- RESULTADOS

7.1.- Estudo 1: “Estudo 1: “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino ”.

7.1.1.- O cultivo *in vitro* de COCs aumenta os DAGs e TAGs nos oócitos.

Não foram observadas diferenças nas quantidades de MAGs entre os oócitos dos grupos maturado *in vivo* e *in vitro*, no entanto, os níveis de MAGs nos oócitos imaturos se mostraram diminuídos quando comparado aos maduros (Figura 2). No entanto, quando analisamos o perfil de MAGs, podemos observar um aumento dos ácidos graxos de cadeia longa nos oócitos maturados *in vitro* comparado aos maturados *in vivo*. Em particular, sete MAG aumentaram ao longo de ambas maturações, *in vivo* e *in vitro* (12:0, 14:0, 16:0, 18:2, 18:3, 24:0 e 26:1). Desses, unicamente o MAG 26:1 está aumentado nos oócitos maturados *in vivo* quando comparado aos oócitos de MIV e os MAGs 12:0, 16:0 18:1, 18:3, 20:4, e 24:0 apresentaram-se aumentados nos oócitos da MIV. Ademais, cinco MAG foram aumentados unicamente durante a MIV (14:1, 16:1, 18:0, 18:1 e 20:0) e o MAG 18:1 diminui durante a maturação *in vivo*.

A quantidade total de DAGs e TAGs aumentaram unicamente durante a MIV. Foram identificados oito DAGs que aumentaram ao longo dos dois sistemas de maturação ((16:0)₂, (17:0)₂, (19:0)₂, (20:2)₂, (20:5)₂, (24:0)₂, (24:1)₂ e (24:4)₂) e cinco que aumentaram unicamente durante a MIV ((18:0)₂, (18:2)₂, (18:3)₂, (20:4)₂, e (22:4)₂). Entre aqueles DAGs que aumentaram durante os dois sistemas de maturação, quatro DAGs estavam aumentados nos oócitos maturados *in vitro* quando comparado aos *in vivo* ((16:0)₂, (24:0)₂, (24:1)₂, e (24:4)₂).

Além do mais, com a exceção do TAGs (17:0)₂ 17:1 que não mostrou diferença entre os grupos *in vitro* e *in vivo*, todos os outros oito TAGs quantificados neste trabalho ((14:0)₂ 16:1, (15:0)₂ 18:1, (16:0)₂ 18:0, (16:2)₂ 18:1, (20:0)₂ 20:1, (20:2)₂ 18:2, (20:4)₂ 18:2, e (20:5)₂ 22:6) mostraram-se aumentados nos oócitos maturados *in vitro* comparado aos maturados *in vivo*.

Figura 2. Identificação e quantificação de MAGs (A e B), DAGs (C e D) e TAGs (E e F) dos oócitos imaturos, maturados *in vivo* e maturados *in vitro* por HPLC-MS, mostrando a quantificação total (A, C e E) ou individual (B, D e F) dos lipídeos neutros. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

7.1.2.- A MIV diminui os níveis de GSH e EROs nos oócitos.

Os níveis de GSH aumentaram durante dos dois sistemas de maturação quando comparados aos oócitos imaturos ($15,43 \pm 7,45$ i.f.), no entanto observou-se um aumento maior nos oócitos do sistema *in vivo* ($30,49 \pm 13,80$ i.f.) quando comparado aos do *in vitro* ($22,84 \pm 8,90$ i.f.) (Figura 3). Mesmo que os níveis de EROs não diferiram entre os oócitos imaturos ($11,39 \pm 4,30$ i.f.) e os maturados, os níveis de EROS nos oócitos maturados *in vivo* ($13,53 \pm 4,54$ i.f.) foram superiores aos da MIV ($10,72 \pm 3,26$ i.f.) (Figura 3).

Figura 3. Quantificação de GSH (A) e EROs (B) nos oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. Para quantificação de GSH e EROs dos oócitos foi mensurada a intensidade de fluorescência dos oócitos corados com $5 \mu\text{M}$ de CellROX Green e $10 \mu\text{M}$ de Celltracker Blue, respectivamente, em imagens capturadas no microscópio confocal LSM 710 (Zeiss) na objetiva de 63X. (C) Imagens representativas de cada grupo para detecção de GSH (azul) e EROS (verde). Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

7.1.3.- A MIV provoca diminuição da atividade mitocondrial nos oócitos.

Houve aumento nos níveis de ATP nos oócitos do grupo *in vitro* ($1,784 \pm 0,333$ pmol/oócito) quando comparado ao *in vivo* ($1,551 \pm 0,420$ pmol/oócito) e imaturo ($1,437 \pm 0,672$ pmol/oócito) (Figura 4). Além disso, foi possível observar uma diminuição dos níveis de ADP nos oócitos maturados *in vivo* ($0,127 \pm 0,126$ pmol/oócito) quando comparado aos maturados *in vitro* ($0,235 \pm 0,165$ pmol/oócito) ou imaturos ($0,176 \pm 0,110$ pmol/oócito). Ainda, para poder avaliar a atividade mitocondrial, foi calculada a razão ATP/ADP. O grupo *in vivo* ($36,88 \pm 37,34$) mostrou maior atividade quando comparado ao *in vitro* ($12,87 \pm 12,53$) e imaturo ($12,74 \pm 12,73$) (Figura 4).

Figura 4. Gráficos da quantificação de ATP **A)**, ADP **B)** e a razão ATP/ADP **C)** nos oócitos imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*. Cada ponto representa um oócito, as linhas representam a média e os colchetes a diferença estatística ($p < 0,05$, exceto se indicado diferentemente)

7.1.4.- A expressão gênica de genes relacionados com metabolismo e estresse celular não é alterada nos oócitos maturados *in vitro*.

Excetuando o gene PGK1, que diminuiu durante a maturação *in vivo*, não foram observadas diferenças nas expressões entre os grupos nos oócitos (Figura 5).

Figura 5. Expressão dos genes relacionados com metabolismo e estresse celular nos oócitos imaturos, maduros *in vivo* e *in vitro*. Com a exceção do *PGK1*, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média. (AG= ácidos graxos; RE= retículo endoplasmático)

7.1.5.- A maioria dos miRNA apresentam níveis similares nos oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*.

Dos 88 miRNA analisados, unicamente a expressão de seis foram alterados pela maturação (Figura 6). A expressão do miR-17-5p diminuiu após a MIV e seis deles aumentaram após a maturação *in vivo* (let-7a-5p, miR-106a, miR-106b, miR-17-5p, miR-23b-3p e miR-365-3p). Quando comparados os oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, os miRNAs bta-miR-106b e bta-miR-17-5p diminuíram a expressão nos oócitos *in vivo* quando comparado aos maturados *in vitro*. A expressão relativa de todos os miRNAs mostra-se no Apêndice I.

Figura 6. Expressão relativa dos miRNAs com diferença significativa nos oócitos imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

7.1.6.- A MIV aumenta os TAGs nas células do cumulus.

A quantidade total de MAGs aumentou após ambas maturações, *in vivo* e *in vitro*, nas células do cumulus (Figura 7A). Quando comparado ao grupo *in vivo*, as células da maturação *in vitro* mostraram menores níveis de MAGs totais, padrão que também se observou em três MAGs específicos (12:0, 20:4, e 22:2) (Figura 7B). No entanto, seis MAGs (14:1, 16:1, 18:1, 18:3, 24:0 e 26:1) foram detectados em maiores quantidades no grupo *in vivo* que no *in vitro*. Além do mais, oito MAGs aumentaram em ambos sistemas de maturação quando comparado às células imaturas (12:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:3, 24:0 e 26:1) (Figura 7B). O MAG 14:1 aumentou unicamente durante a MIV e os MAGs 14:0, 18:2, 20:0, 20:4 e 22:2 durante o sistema *in vivo* (Figura 7B).

A MIV causou um aumento nos TAGs nas células do cumulus que não foi observado no sistema *in vivo*. Similarmente, sete TAGs ((15:0)₂ 18:1, (16:0)₂ 18:0, (16:2)₂ 18:1, (17:0)₂ 17:1, (20:0)₂ 20:1, (20:2)₂ 18:2, e (20:4)₂ 18:2) mostraram maiores níveis nas células do cumulus maturadas *in vitro* quando comparadas às maturadas *in vivo*. Os nove TAGs aumentaram durante a MIV, no entanto quatro TAGs não mostraram o mesmo comportamento durante o sistema *in vivo* ((16:0)₂ 18:0, (16:2)₂ 18:1, (20:2)₂ 18:2, e (20:4)₂ 18:2).

Assim como os TAGs, a quantidade total de DAGs aumentou durante a MIV e não durante o sistema *in vivo*. Durante a MIV 13 DAGs aumentaram ((15:0)₂, (16:0)₂, (17:0)₂, (18:1)₂, (18:2)₂, (18:3)₂, (19:0)₂, (20:4)₂, (20:5)₂, (22:4)₂, (24:0)₂, (24:1)₂ e (24:4)₂) e cinco desses também durante a maturação *in vivo* ((15:0)₂, (16:0)₂, (19:0)₂, (20:5)₂ e (22:4)₂). Além disso, 13 DAGs foram encontrados em maiores níveis nas células do cumulus da MIV que do sistema *in vivo* ((15:0)₂, (17:0)₂, (18:0)₂, (18:1)₂, (18:2)₂, (18:3)₂, (19:0)₂, (20:4)₂, (20:5)₂, (22:4)₂, (24:0)₂, (24:1)₂ e (24:4)₂).

Figura 7. Identificação e quantificação de MAGs (A e B), DAGs (C e D) e TAGs (E e F) das células do cumulus de COCs imaturos, maturados *in vivo* e maturados *in vitro* por HPLC-MS/MS, mostrando a quantificação total (A, C e E) ou individual (B, D e F) dos lipídeos neutros. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

Identificação e quantificação de MAGs, DAGs e TAGs por HPLC-MS/MS nas células do *cumulus*

7.1.7.- A expressão dos genes relacionados com metabolismo e estresse celular apresentam-se alterados nas células do cumulus maturadas *in vitro*.

Os genes *ACACA*, *PLIN2*, *SCD*, *ACSL3*, *CPT1a*, *CPT2*, *G6PD* e *PKG1* do metabolismo de ácidos graxos e glicose apresentaram aumento de expressão nas células do cumulus entre grupos imaturos e maduros, independentemente do sistema de maturação (Figura 8). Decréscimos de expressão comparando-se aos imaturos e maduros *in vivo* foram observados para os transcritos de *SREBP1*, *FASN* e *ELOVL6* (Figura 8).

Figura 8. Expressão dos genes relacionados com metabolismo e estresse celular nas células do cumulus de COCs imaturos, maduros *in vivo* e *in vitro*. Diferentes letras dentro do mesmo indicam diferenças estatística ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média. (AG= ácidos graxos; RE= retículo endoplasmático)

Os transcritos de *SREBP1*, *ACSL6*, *CPT1b* e *PFKP* elevaram-se apenas após a MIV; e alguns genes, como o *ACACA*, *PLIN2*, *SCD*, *G6PD* e *PKG1*, embora

apresentando o mesmo perfil de elevação durante a maturação, foram superiores no grupo *in vitro* comparado ao *in vivo*; ou inversamente, como o *CPT1A*, superior no *in vivo* comparado ao *in vitro* (Figura 8). Variações entre expressão de isoformas também foram observadas, com o *PLIN2* e *CPT1A* expressos de níveis mais elevados que *PLIN3* e *CPT1B*, respectivamente (Figura 8). Em suma, o processo de maturação altera a expressão destes genes nas células do cumulus e a maturação *in vitro* está associada a desregulação do padrão de expressão de alguns destes genes.

Genes associados ao estresse de RE e apoptose apresentaram aumento (*ATF6*, *BAX*, *BCL2* e *CASP9*) ou decréscimo (*CHOP10* e *GRP78*) de expressão nas células do cumulus após maturação em comparação àquelas imaturas (Figura 8). Adicionalmente, *CASP3* elevou-se apenas após MIV em comparação aos imaturos. A expressão de *BAX* e *BCL2* foi superior no grupo *in vitro* comparado ao *in vivo*. Os transcritos de *IRE1*, *PERK* e *ATF4* mantiveram-se estáveis durante a maturação.

Genes das vias de resposta ao estresse oxidativo e de RE também apresentaram diferenças entre grupos (Figura 8). Os padrões de expressão dos genes *NRF2*, *KEAP1*, *SOD1*, *GPX4*, *PRDX1* e *CAT* modificaram-se após a maturação, com destaque para a alteração nos transcritos de *NRF2* que se elevou após a maturação, e foi superior no grupo *in vivo* comparado ao *in vitro*. O inibidor de *NRF2*, *KEAP1*, sofreu elevação em relação ao imaturo em células do cumulus de ambos maturos, *in vivo* e *in vitro*. Outras variações incluem decréscimos de *GPX4* independentemente do sistema de maturação, aumento de *SOD1* e *CAT* após maturação *in vitro* e de *PRDX1* após maturação *in vivo*.

7.1.8.- Expressão de miRNAs em oócitos e células do cumulus após maturação *in vivo* e *in vitro*

O total de 19 miRNAs variou ao longo da maturação. Destes, sete miRNAs (miR-181b, miR-181d, miR-182, miR-204, miR-218, miR-27a-3p, miR-29d-5 e bta-miR-96) aumentaram e dois miRNAs (miR-23a e miR-23b-3p) diminuíram nas células do cumulus após a MIV quando comparado aos oócitos imaturos (Figura 9). Durante a maturação *in vivo*, 11 miRNAs (miR-181d, miR-182, miR-186, miR-199a-3p, miR-200c, miR-223, miR-27a-3p, miR-29c, miR-29d-5p, miR-424-5p e miR-96) aumentaram e três miRNAs (miR-17-5p, miR-23b-3p, e miR-330) diminuíram nas

células do cumulus. Quando comparados oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, a expressão de dois miRNAs (miR-218 e miR-330) estavam aumentados e seis miRNAs (miR-182, miR-199a-3p, miR-200c, miR-223, miR-23a e miR-424-5p) estavam diminuídos nas células do cumulus depois da MIV quando comparado aos maturados *in vivo*. Os valores de expressão gênica estão apresentados no Apêndice I.

Figura 9. Heatmap com agrupamento hierárquico representando os níveis de expressão dos miRNAs diferentemente expressos nas células do cumulus imaturas, maturadas *in vivo* e *in vitro*.

7.1.9.- A MIV não muda os padrões de metilação da região promotora do CPT1A nas células do cumulus.

Análises de ilhas de CpG na região promotora do gene *CPT1A* mostraram uma ilha com 12 sítios CpGs. Desses, nove estavam 100% metilado nos três grupos e mostraram diferentes padrões de metilação (Figura 10). Especificamente, a posição 1 estava 75%, 75% e 70% de metilação nos grupos imaturos, *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. As posições 6 e 7 estavam não metilados em 18,7% dos plasmídeos

clonados no grupo imaturo. O sítio CpG da posição 8 somente estava presente em alguns dos clones, uma vez que a guanina dessa posição estava em um sítio de polimorfismo de base única (SNP), que alternava com uma citosina. Entre os que possuíam esse CpG, o grupo imaturo apresentou 100% de metilação (6 de 6), enquanto o grupo *in vivo* apresentou 28,6% de metilação (2 de 7) e o grupo *in vitro* apresentou 20% de metilação (1 de 5). Na posição 12, unicamente um clone do grupo *in vitro* continha uma citosina não metilada (10% do total).

Figura 10. Níveis de metilação na região promotora do gene CPT1A nas células do cumulus imaturas e maturadas *in vitro* e *in vivo*. Cada linha representa cada clone. Os pontos pretos representam as CpGs metiladas e os pontos brancos as não metiladas.

7.2.- Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3* - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”.

7.2.1.- A MIV provoca aumento do conteúdo lipídico no COC.

Para investigar a dinâmica do conteúdo lipídico durante a MIV e *in vivo* no COC, foi quantificada a área lipídica dos oócitos e foi quantificada a proteína PLIN2 nas

células do cumulus. Tanto nos oócitos, quanto nas células do cumulus, foi verificado que a MIV provoca um aumento no conteúdo lipídico que não observamos no processo *in vivo* (Figura 11). Foi observado que oócitos após a MIV ($7,88 \pm 3,84$) possuem mais gotas lipídicas que aqueles imaturos ($3,69 \pm 1,89$) ou maturados *in vivo* ($4,61 \pm 3,22$). Com respeito a quantificação da PLIN2, também foi observada maiores níveis da proteína nas células do cumulus da MIV do que dos imaturos e maturados *in vivo* (Figura 11).

Figura 11. Quantificação lipídica nas células do cumulus e oócitos de COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. (A) Quantificação lipídica das células do cumulus avaliada pela quantificação da proteína perilipina 2 (PLIN2), sendo normalizada pela histona 3 (H3). (B) Quantificação lipídica nos oócitos realizada pela identificação e quantificação das gotas lipídicas por técnicas fluorimétricas no microscópio confocal mediante a fluoróforo BODIPY 493/503. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

* A ordem dos grupos entre o gráfico e as imagens representativas do western blot está diferente.

7.2.2.- A MIV aumenta os níveis de transcritos e proteína da FABP3 nas células do cumulus.

Com intuito de investigar o efeito da MIV na função da FABP3, foram determinados os níveis de expressão gênica da FABP3 nos oócitos e células do cumulus e foi quantificada a proteína FABP3 nas células do cumulus dos grupos imaturo, *in vivo* e *in vitro* (Figura 12). Foi observado que os níveis de expressão da

FABP3 nas células do cumulus aumentam durante a MIV e não durante o sistema *in vivo*. Interessantemente, os níveis de transcritos nos oócitos mostraram-se iguais nos grupos. Similarmente, seguindo o mesmo padrão da expressão gênica, os níveis proteicos da FABP3 aumentaram durante a MIV nas células do cumulus quando comparado às células imaturas e maturadas *in vivo*.

Figura 12. (a) Expressão relativa da *FABP3* nas células do cumulus e oócitos de COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. (b) Níveis proteicos da *FABP3* nas células do cumulus, normalizados pela α -Tubulina (TUBA). Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

7.2.3.- A *FABP3* está localizada nas TZPs durante a MIV.

Na sequência investigamos se a *FABP3* estava presente dentro das TZPs nos COC durante a MIV. Foram obtidas séries de imagens de imunofluorescência de COCs imaturos e maturados por 9 e 18 horas. Observamos a presença da *FABP3* ao longo das TZPs nos COCs imaturos (Figura 13 e Apêndice J).

Figura 13. Análises de microscopia confocal demonstrando a presença da FABP3 dentro das TZPs nos COCs imaturos. A FABP3 foi imunolocalizada utilizando a Alexa Fluor 488 (verde); as TZPs (actina) foi detectada mediante a Alexa Fluor 647 faloidina (vermelho) e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). (A) As fotomicrografias dos COCs imaturos foram obtidas na obtiva de 63 X em óleo e (B) em objetiva de 63 X com zoom de 3.5 X. (C) Zoom digital mostrando a FABP3 (seta) dentro de TZPs (asterisco) na zona pelúcida (OO = oócito; CC = células do cumulus). O total de 12 COC imaturos foram analisados e mostraram padrões similares; imagens de 6 COCs adicionais estão apresentados no Apêndice J.

Após 9 horas de MIV, a quantidade de FABP3 presente nas TZPs aumentou (Figura 14 e Apêndice K).

Figura 14. Análises de microscopia confocal demonstrando a presença da FABP3 dentro das TZPs nos COCs após 9 horas de MIV. A FABP3 foi imunolocalizada utilizando a Alexa Fluor 488 (verde); as TZPs (actina) foi detectada mediante a Alexa Fluor 647 faloidina (vermelho) e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). (A) As fotomicrografias dos COCs imaturos foram obtidas na obtiva de 63 X em óleo e (B) em objetiva de 63 X com zoom de 3.5 X. (C) Zoom digital mostrando a FABP3 (seta) dentro de TZPs (asterisco) na zona pelúcida (OO = oócito; CC = células do cumulus). 12 COC maturados *in vitro* por 9 horas foram analisados e mostraram padrão similar (Apêndice K).

Para verificar se a presença de FABP3 na zona pelúcida (ZP) é dependente da presença das TZPs, oócitos desnudos e parcialmente desnudos foram maturados por 9 horas e foi realizada a imunofluorescência neles (Figura 15 e Apêndice L e M). Não fomos capazes de detectar FABP3 nas ZP dos oócitos desnudos, sugerindo a necessidade da presença das TZPs para o transporte da FABP3 entre células do cumulus e oócito (Figura 15A e B). Além disso, nos oócitos parcialmente desnudos, unicamente foi observado FABP3 onde as TZPs estavam presentes na ZP (Figura

15C e D), descartando a possibilidade da movimentação da FABP3 entre as células do cumulus e o oócito por outros mecanismos.

Figura 15. Análises de microscopia confocal da FABP3 nas TZPs de oócitos desnudos ou parcialmente desnudos cultivados *in vitro* por 9 horas. (A) Imagens adquiridas de oócitos desnudos mostrando ausência de FABP3 e TZPs na zona pelúcida. (B) Imagem ampliada da porção de um oócitos desnudos mostrando ausência da FABP3 e TZPs na zona pelúcida. (C) Imagens obtidas de oócitos parcialmente desnudos demonstrando a presença da FABP3 nas regiões que existe presença de TZPs na zona pelúcida. (D) Imagem ampliada da porção do oócitos parcialmente desnudo mostrando a completa ausência de FABP3 e TZPs na área sem células do cumulus, e a presença da FABP3 e TZPs na área com células do cumulus. A FABP3 foi imunolocalizada utilizando a Alexa Fluor 488 (verde); as TZPs (actina) foi detectada mediante a Alexa Fluor 647 faloidina (vermelho) e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas na objetiva de 63 X (A e C), e a sobreposição das z-stack com zoom digital (B e D) para mostrar a ausência (B) ou presença (D) da FABP3 ao longo das TZPs. (OO = oócito; CC = células do cumulus). ** ausência de TZPs e FABP3. O total de 10 oócitos desnudos e 11 parcialmente desnudos durante as primeiras 9 horas da MIV foram analisados e mostraram padrões similares; imagens de 6 oócitos desnudos e 6 oócitos parcialmente desnudos adicionais estão apresentados nos Apêndices L e M.

Adicionalmente, dado que o transporte mediado por TZP cessa quando o oócito madura, foi investigado a localização da FABP3 e TZPs depois de 18 horas de MIV. Como esperado, observamos a desconexão das TZPs do ooplasma e a localização

da FABP3 na porção mais terminal das TZPs (Figura 16 e Apêndice N), sugerindo que a FABP3 se dirige em direção oócito.

Figura 16. Análises de microscopia confocal de COCs após 18 horas de MIV. (A) fotomicrografia da imunodeteção da FABP3 após 18 de MIV. (B) Fotomicrografia capturada em objetiva de 63 X e zoom de 3,5 X para visão detalhada. (C) Zoom digital mostrando detalhes da porção terminal da TZP desconectada do ooplasma: A FABP3 foi imunolocalizada utilizando a Alexa Fluor 488 (verde); as TZPs (actina) foi detectada mediante a Alexa Fluor 647 faloidina (vermelho) e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas na objetiva de 63 X (A) e na objetiva de 63 X com zoom de 3,5 (B). O zoom digital (C) mostrando poucas moléculas de FABP3 (seta) na porção terminal da TZP (asterisco) no espaço perivitelínico (PVS) entre o oócito (OO) e a zona pelúcida. (CC = células do cumulus; PB = primeiro corpúsculo polar). O total de 15 COC após 18 horas de MIV foram analisados e mostraram padrões similares; imagens de 6 COCs adicionais estão apresentadas no Apêndice N.

Resumindo, os resultados obtidos demonstraram que a FABP3 está presente nas TZPs nos COCs imaturos e maturados por 9 e 18 horas (Figura 17A e B). Além do mais, após 18 horas de maturação, quando acontece a extrusão do primeiro corpúsculo polar, as TZPs são desconectadas do ooplasma e as moléculas de FABP3 são acumuladas nas porções finais das projeções (Figura 17C).

Figura 17. Análises de microscopia confocal de COCs em diferentes estágios de maturação oocitária (sobreposição das imagens do *z-stack*) na objetiva de 63 X com zoom digital. (A) Fotomicrografia mostrando a localização da FABP3 nas TZPs no COC imaturo. (B) Fotomicrografia mostrando a localização da FABP3 nas TZPs no COC após 9 horas de MIV. (C) Fotomicrografia mostrando a localização da FABP3 nas TZPs no COC após 18 horas de MIV. Setas indicam FABP3 nas TZPs. A FABP3 foi imunolocalizada utilizando a Alexa Fluor 488 (verde); as TZPs (actina) foram detectadas mediante a Alexa Fluor 647 faloidina (vermelho) e os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

O controle negativo foi realizado para cada rotina de imunofluorescência e estas amostras foram expostas á máxima potencia do laser e não foram identificados sinais dentro da ZP, descartando que os sinais foram um artefato (Apêndice O).

7.2.4.- Os níveis proteicos da FABP3 e o conteúdo lipídico aumentam nas primeiras 9 horas da MIV nos oócitos.

Uma vez que nossos dados sugeriram uma movimentação da FABP3 a partir das células do cumulus em direção ao oócito, era esperado o aumento dos níveis

proteicos da FABP3, assim como do conteúdo lipídico, durante a MIV no oócitos. Com intuito de verificar esse fenômeno, foi realizado a análise por western blot da FABP3 e a detecção de gotas lipídicas nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* por 9 e 18 horas. As análises da proteína revelaram um aumento de ~1,55 vezes nos níveis de FABP3 entre os oócitos imaturos e os maturados por 9 horas, sendo que não foi encontrada diferença entre os oócitos de 9 e 18 horas de maturação (Figura 18A). As análises das gotas lipídicas mostraram um aumento de ~1,44 vezes no acúmulo lipídico nas primeiras 9 horas da MIV (Figura 18B). Interessantemente, não foram observadas diferenças de conteúdo lipídico nos oócitos maturados por 9 horas comparado com os maturados por 18 horas, sugerindo que não exista acúmulo durante este período. Por isso, os resultados sugerem que exista um acúmulo simultâneo da FABP3 e lipídeos no oócito nas primeiras 9 horas de MIV.

Figura 18. Níveis proteicos de FABP3 e conteúdos lipídicos nos oócitos de COCs imaturos e maturados *in vitro* por 9 e 18 horas. (A) Quantificação lipídica de oócitos realizada pela técnica de western blot para FABP3 e utilizando a x-tubulina (TUBA) como normalizador. (b) Quantificação lipídica oocitária. Os valores de conteúdos lipídicos estão representados pela razão da área das gotas lipídicas e a área total. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

7.2.5.- A remoção das TZPs nos oócitos causa diminuição do conteúdo lipídico oocitário.

Dado que os resultados obtidos sugeriram que o transporte de lipídeos desde as células do cumulus até o oócitos é TZP-dependente, foi realizada a remoção das TZPs para esclarecer o papel delas do acúmulo lipídico. Para esse propósito, foi utilizada a citocalasina-B, um agente que inibe a polimerização dos filamentos de actina e promove a desestruturação do citoesqueleto, e consequentemente, das TZPs. Os COCs foram expostos à citocalasina-B durante as primeiras 9 horas da MIV para verificar se o conteúdo lipídico é afetado. Os resultados demonstram que a maioria das TZPs são removidas com a suplementação da citocalasina durante a MIV (Figuras 19A-D e Apêndice P e Q). O conteúdo total de lipídeos oocitários diminuiu naqueles expostos à citocalasina-B na MIV quando comparado aos controles (Figura 19E), indicando que as TZPs aparentam ser necessárias para a ocorrência do acúmulo lipídico.

Figura 19. Análises de microscopia confocal da FABP3 nos COCs após a MIV com ausência (Controle) ou presença de citocalasina-B. (A) e (C) Fotomicrografias mostrando as TZPs e FABP3 no grupo controle. (B) e (D) Fotomicrografias mostrando a remoção da maior parte de TZPs e FABP3 na zona pelúcida no grupo citocalasina-B. A FABP3 foi imunolocalizada utilizando o Alexa Fluor 488 (verde); as TZPs (actina) foram detectada mediante a Alexa Fluor 647 faloidina (vermelho) e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). As fotomicrografias foram obtidas na objetiva de 63 X (A e C); e na objetiva de 63 X com zoom de 3,5 x (B e D). CC = células do cumulus; ZP = zona pelúcida; OO = oócitos. ** indicam a retração e bloqueio da formação das TZPs pela Citocalasina-B. O total de 10 COCs do grupo controle e 10 do grupo tratado foram analisados e mostraram padrões similares; imagens de 6 COCs adicionais de cada grupo estão apresentados nos Apêndices N e O. (E) Conteúdo lipídico dos oócitos de COCs após 9 horas de MIV com a ausência ou presença da Citocalasina-B. A quantificação lipídica foi realizada por técnica fluorimétrica para detecção das gotas no microscópio confocal mediante coloração com BODIPY 493/503. Os valores de conteúdos lipídicos estão representados pela razão da área das gotas lipídicas e a área total. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

7.3.- Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*”.

7.3.1.- A PIVE bovinos em baixa tensão de oxigênio acarreta em aumento de lípideos e de EROs quando comparado ao sistema *in vivo*.

Mesmo o CIV tendo sido realizado em baixa tensão de oxigênio e sem soro, o sistema *in vitro* provocou aumento do conteúdo lipídico ($0,143 \pm 0,085$) nos embriões quando comparado ao sistema *in vivo* ($0,115 \pm 0,089$) (Figura 20).

Figura 20. (A) Quantificação lipídica nos embriões realizada pela identificação e quantificação das gotas lipídicas e quantificação de blastômeros por técnicas fluorimétricas no microscópio confocal mediante a coloração com BODIPY 493/503 e Hoechst 33342. Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média. (B) Microfotografias representativas das colorações de Hoechst 33342 (azul) e BODIPY 493/503 (verde) de cada grupo.

Os embriões produzidos *in vitro* ($10,81 \pm 4,6$) possuíam maiores níveis de EROs que os produzidos *in vivo* ($4,79 \pm 1,6$). No entanto, não conseguimos observar diferenças nos níveis de GSH entre os grupos (*in vivo*; $32,16 \pm 12,02$ e *in vitro*; $40,54 \pm 21,54$) (Figura 21).

Figura 21. Quantificação de EROs (A) e GSH (B) nos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Para quantificação de GSH e EROs dos embriões foi mensurada a intensidade de fluorescência dos blastocistos corados com $5 \mu\text{M}$ de CellROX Green e $10 \mu\text{M}$ de Celltracker Blue, respectivamente, das imagens capturadas no microscópio confocal Leica SP5 na objetiva de 63X. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média. Abaixo do gráfico estão fotomicrografias representativas das colorações para quantificação de EROs (verde) e GSH (azul) de cada grupo.

7.3.2.- A expressão dos genes relacionados com metabolismo lipídico e homeostase é pouco alterada na PIVE em baixa tensão de oxigênio

A expressão de genes relacionados com metabolismo lipídico e homeostase na produção *in vivo* e *in vitro* foi pouco alterada (Figura 22). Unicamente 5 genes tiveram a expressão diferente entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*: os genes

ACACA, *ATF4* e *GPX1* tiveram a expressão aumentada e o *GRP78* e *CHOP10* diminuída nos embriões produzidos *in vivo* comparado àqueles da produção *in vitro*.

Figura 22. Expressão dos genes relacionados com metabolismo lipídico, beta-oxidação, estresse celular e apoptose e resposta ao estresse celular blastocisto produzidos *in vivo* e *in vitro*. Diferentes letras dentro do mesmo indicam diferenças estatística ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média

7.4.- Estudo 4: “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”

7.4.1.- Comparação do perfil de miRNAs dos oócitos durante a maturação *in vivo* e *in vitro*.

Dos 260 miRNAs analisados, 217 foram expressos nos oócitos. Alguns deles mostraram ser exclusivos de grupos: 13 miRNAs unicamente apareceram nos oócitos imaturos, 6 miRNAs foram exclusivos no grupo *in vivo* e 6 miRNAs foram expressos unicamente nos oócitos maturados *in vitro* (Tabela 6 e Figura 23). Um total de 145 miRNAs foram identificados em todos os grupos experimentais, 15 miRNAs foram iguais entre os imaturos e *in vivo*, 22 miRNAs entre imaturo e *in vitro* e 10 miRNAs entre *in vitro* e *in vivo*. Os valores de expressão destes miRNAs estão apresentados no Apêndice R.

Figura 23. Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos miRNAs identificados nos oócitos (OO) de COCs imaturos, maturados *in vitro* e maturados *in vivo*.

Os miRNAs exclusivos para cada grupo modulam diferentes vias, conforme descrito a seguir. Para os miRNAs exclusivos nos oócitos imaturos (Tabela 6) a via que mostrou estar mais regulada foi a via de sinalização do TFG-beta, seguida de vias de pluripotência, vias relacionadas com adesão celular e vias de sinalização como a Hippo, FoxO, HIF-1, p53 e mTOR (Figura 24).

Tabela 6. Lista dos miRNAs expressos exclusivamente em oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*.

miRNAs exclusivos nos oócitos		
Imaturo	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
bta-let7a-3p	bta-miR-200a	bta-miR-1
bta-miR-126-5p	bta-miR-22-3p	bta-miR-183
bta-miR-145	bta-miR-376a	bta-miR-196b
bta-miR-199a-3p	bta-miR-489	bta-miR-24
bta-miR-208a	bta-miR-496	bta-miR-760-3p
bta-miR-212	bta-miR-655	bta-miR-935
bta-miR-216b		
bta-miR-454		
bta-miR-483		
bta-miR-551a		
bta-miR-551b		
bta-miR-761		
bta-miR-876		

Figura 24. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que se encontravam exclusivos nos oócitos imaturos, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

O enriquecimento das vias reguladas pelos 6 miRNAs expressos exclusivamente nos oócitos maturados *in vivo* (Tabela 6), obteve como vias mais moduladas a de biossíntese de ácidos graxos e vias de sinalização Hippo, TGF-beta, FoxO, do estrógeno e de pluripotência de células tronco. Além disso, também mostraram regular vias de adesão celular e biossíntese de glicosaminoglicanos (Figura 25).

Figura 25. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que se encontravam exclusivos nos oócitos maturados *in vivo*, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs exclusivos dos oócitos maturados *in vivo*

Já os 6 miRNAs exclusivos da MIV (Tabela 6) demonstraram modular vias de adesão, sinalização Hippo FoxO e p53, ciclo celular, do estrógeno e TGF-beta, além de regular o citoesqueleto da actina e junções comunicantes, entre outras (Figura 26).

Figura 26. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que se encontravam exclusivos nos oócitos maturados *in vivo* organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs exclusivos dos oócitos maturados *in vitro*

Apenas 9 miRNAs apresentaram diferença estatística entre os grupos (miR-100, miR-105b, miR-155, miR-21-5p, miR-451, miR-505, miR-9-5p, miR-99a-5p, miR-210-3p) (Figura 27A). O padrão de expressão e agrupamento destes miRNAs diferentemente expressos através do Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais (Figura 27B) mostra uma maior diferença entre o grupo imaturo e *in vitro* e maior similaridade entre os miRNAs expressos nos oócitos imaturos e maturados *in vivo*.

A expressão do miR-210 diminui na maturação *in vivo* e não é identificado na *in vitro* (Figura 28), e o miR-451 é o único dentre os 9 aumentado unicamente durante a maturação *in vivo* (Figura 29). O bta-miR-210 não tem genes, nem vias, preditos validados no DIANA tools. No entanto, artigos mostram que ele é um indicador de hipóxia em ovários com câncer (Giannakakis *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). O miR-451 modula vias importantes de sinalização (mTOR e AMPK) e apoptose e foi o único

miRNA que apresentou maior níveis de expressão nos oócitos maturados *in vivo* quando comparado aos *in vitro* (Figura 29).

Figura 27. Heatmap com agrupamento hierárquico (A) e análise de componentes principais (B) dos valores de expressão representando os padrões de expressão e agrupamento das amostras e dos miRNAs estatisticamente diferentes expressos e identificados nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* e *in vivo*.

Figura 28. Expressão relativa do bta-miR-210 nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* e *in vivo*.

Figura 29. Expressão relativa do bta-mi451 nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* e *in vivo* (A) e as vias preditas reguladas por ele (B).

Dentro dos miRNAs presentes em todos os grupos, os miRNAs miR-155 e miR-21-5p aumentaram durante a MIV comparado ao sistema *in vivo* (Figura 30). Esses dois miRNAs regulam vias de metabolismo como vias de elongação, metabolismo e degradação de ácidos graxos e biossíntese de ácidos graxos insaturados (Figura 30). Além disso mostraram regular vias de sinalização importantes como a via TGF-beta, FoxO, Hippo e TNF.

Figura 30. Expressão relativa do bta-miR-155 e bta-miR-21-5p nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* e *in vivo* (A) e as vias preditas reguladas por ele (B).

Os miR-100, miR-105b, miR-9- 5p e miR-99a-5p diminuíram durante a maturação *in vivo* nos oócitos (Figura 31). Estes são reesponsáveis por regular vias como; biossíntese de ácidos graxos, junções aderentes, ciclo celular, ribossomos, biossíntese de glicoesfingolipídeos, metabolismo de ácidos graxos, vias de sinalização p53 e TNF e meiose oocitária.

Figura 31. Expressão relativa dos miRNA que diminuem durante a maturação *in vivo* em oócitos (A) e as vias preditas reguladas por eles (B).

7.4.2.- Comparação do perfil de miRNAs das células do cumulus durante a maturação *in vivo* e *in vitro*.

Dos 260 miRNA analisados nas células do cumulus, 249 miRNAs foram expressos nas células do cumulus. Dentre estes, 7 foram exclusivamente identificados no grupo imaturo, 4 no grupo *in vitro* e 9 no grupo *in vivo*. Um total de 182 miRNAs foram identificados em todos os grupos experimentais, 11 miRNAs foram expressos nos imaturos e *in vivo*, 14 miRNAs nos imaturo e *in vitro* e 18 miRNAs nos oócitos maturados *in vitro* e *in vivo* (Figura 32).

Figura 32. Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos miRNAs identificados nas células do cumulus (CC) de COCs imaturos, maturados *in vitro* e maturados *in vivo*.

Tabela 7. Lista dos miRNAs expressos exclusivamente em células do cumulus de COCs imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*.

miRNAs exclusivos nas células do cumulus		
Imaturo	In vivo	In vitro
bta-miR-345-5p	bta-miR-126-5p	bta-miR-369-3p
bta-miR-369-5p	bta-miR-133b	bta-miR-410
bta-miR-377	bta-miR-150	bta-miR-433
bta-miR-485	bta-miR-22-3p	bta-miR-493
bta-miR-599	bta-miR-376c	
bta-miR-885	bta-miR-424-3p	
bta-miR-935	bta-miR-483	
	bta-miR-487a	
	bta-miR-542-5p	

Os miRNAs expressos exclusivamente nas células do cumulus de COCs imaturos (Tabela 7) demonstraram modular vias de sinalização como da TGF-beta, foxO, fosfatidilinositol, HIF-1, pluripotência e p53, além de estar regulando o ciclo celular e a maturação oocitária mediado por progesterona e junções aderentes e comunicantes (Figura 33).

Figura 33. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que se encontravam exclusivos nos oócitos imaturos, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs exclusivos das células do cumulus imaturas

Os 9 miRNAs exclusivos do grupo *in vivo* (Tabela 7) mostraram regular vias de sinalização Hippo, biossíntese de ácidos graxos, ciclo celular, junções aderentes, vias TGF-beta e foxO, meiose oocitária, adesão focal, via de sinalização do estrógeno e processo proteico no retículo endoplasmático (Figura 34).

Figura 34. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que se encontravam exclusivos nos oócitos maturados *in vivo*, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs exclusivos das células do cumulus maturadas *in vivo*

Além do mais, vias de sinalização do TGF-beta, Hippo e pluripotência, de junções aderentes, vias do PI3K-Akt, FoxO e mTORs, de biossíntese de N-glicanos e a via de sinalização WNT mostraram estar moduladas pelos miRNAs expressos exclusivamente nas células do cumulus maturadas *in vitro* (Tabela 7 e Figura 35).

Figura 35. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que se encontravam exclusivos nos oócitos maturados *in vitro*, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs exclusivos das células do cumulus maturadas *in vitro*

De todos os miRNAs, 49 miRNAs apresentaram diferença estatística no grupo de células do cumulus. Com base nos resultados analisamos o padrão de expressão e agrupamento destes 49 miRNAs diferentemente expressos através do Heatmap com agrupamento hierárquico e análise dos componentes principais (Figura 36). Os resultados indicam maior similaridade das amostras dentro do mesmo grupo e diferenças entre grupos.

Figura 36. Heatmap com agrupamento hierárquico (A) e análise de componentes principais (B) dos valores de expressão representando os padrões de expressão e agrupamento das amostras e dos miRNAs estatisticamente diferentes expressos e identificados nas células do cumulus de COCs imaturos e maturados *in vitro* e *in vivo*.

Destes 49, 4 miRNAs (miR-155, miR-21-5p, miR-29d-5p e miR-708; figura 37) aumentaram e 9 (miR-7c, miR-10b, miR-151-3p, miR-193a-5p, miR-193b, miR-197, miR-27b, miR-342, miR-505; Figura 39) diminuíram a expressão durante as duas maturações (*in vivo* e *in vitro*).

Figura 37. Expressão relativa dos miRNAs que aumentaram sua expressão durante a maturação (*in vivo* ou *in vitro*). Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

A via mais regulada por aqueles que aumentaram durante a maturação foi a via de alongação de ácidos graxos (Figura 38). Outras vias de regulação de ácidos graxos como as vias de metabolismo e degradação de ácidos graxos e de biossíntese de ácidos graxos insaturado também mostraram estar moduladas por estes miRNA. Além disso, vias de sinalização TGF-beta, FOX, Hippo e TNF parecem estar reguladas pelos miRNAs aumentados durante as duas maturações.

Figura 38. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que aumentam durante a maturação nas células do cumulus, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs que aumentam durante a maturação nas células do cumulus

Os 9 miRNAs que diminuíram sua expressão independente do sistema de maturação (*in vivo* ou *in vitro*; Figura 39) modulam principalmente as vias de sinalização Hippo, de degradação de lisinas, de sinalização TGF-beta, junções aderentes, ciclo celular, biossíntese de ácidos graxos, meiose dos oócitos, interação de receptor ECM, sinalização do estrogênio e adesão focal (Figura 40).

Figura 39. Expressão relativas dos miRNAs que diminuíram sua expressão durante a maturação (*in vivo* ou *in vitro*). Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

miRNAs que diminuem durante a maturação nas células do cumulus

Figura 40. Gráficos mostrando as vias preditas como controladas pelos miRNAs que diminuíram durante a maturação nas células do cumulus, organizadas pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) (esquerda) ou número de genes regulados (direita).

Vias preditas reguladas pelos miRNAs que diminuem durante a maturação nas células do cumulus

Além disso, 5 miRNAs (miR-126-3p, miR-28-5p, miR-29a-3p, miR-451a, miR-652-3p) mostraram-se aumentados apenas durante a maturação *in vivo* (Figura 41) e 2 durante a MIV (miR-299 e miR-9-5p), sendo que o miR-299 não foi identificado no grupo *in vivo* (Figura 43).

Figura 41. Expressão relativa dos miRNAs que aumentaram sua expressão durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus. Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

miRNAs que aumentam durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus

Os 5 miRNAs que aumentaram a expressão na maturação *in vivo* regulam vias de interação receptor ECM, biossíntese, metabolismo e alongação de ácidos graxos, vias de sinalização (Hippo, PI3K-Akt, mTOR e FoxO), de degradação de lisina e junções aderentes (Figura 42).

Figura 42. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que aumentam durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs que aumentam durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus

O bta-miR-9-5p e bta-miR-299 que aumentaram durante a MIV (Figura 43) modulam vias de interação de receptor ECM, junções aderentes, degradação de lisina, sinalização Hippo, biossíntese de esteroides e adesão focal (Figura 44).

Figura 43. Expressão relativa dos miRNAs que aumentaram sua expressão durante a maturação *in vitro* nas células do cumulus. Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

Figura 44. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que aumentam durante a maturação *in vitro* nas células do cumulus, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs que aumentam durante a maturação *in vitro* nas células do cumulus

Um total de 20 miRNAs diminuíram durante a maturação *in vivo* (miR-7d-5p, miR-7e-5p, miR-127-3p, miR-130b-3p, miR-138-5p, miR-139-5p, miR-191-5p, miR-192-5p, miR-208a-3p, miR-23b-5p, miR-296-3p, miR-361-5p, miR-363-3p, miR-375,

miR-488-3p, miR-664b-3p, miR-761, miR-874-3p, miR-877-5p, miR-105-5p; Figura 45). Apenas 4 miRNAs (miR-128, miR-224, miR-107 e miR-340) diminuíram durante a MIV (Figura 47).

Vias de junções aderentes, de sinalização Hippo, de degradação celular, ciclo celular, do processamento proteico no retículo endoplasmático, vias de sinalização do estrogênio, TGF-beta, pluripotência e FoxO e a via da endocitose são modulados pelos 20 miRNA que diminuíram durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus (Figura 46).

Figura 45. Expressão relativa dos miRNAs que diminuíram sua expressão durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus. Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

Figura 46. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que diminuem durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs que diminuem durante a maturação *in vivo* nas células do cumulus

Os 4 miRNAs menos expressos após a MIV (Figura 47) mostraram modular genes de vias de ácidos graxos (metabolismo, biossíntese, elongação e degradação). Além disso, estes miRNAs regulam vias de degradação de lisina, junções aderentes, endocitose, meiose de oócito e vias de maturação oocitária mediada por progesterona (Figura 48).

Figura 47. Expressão relativa dos miRNAs que diminuíram sua expressão durante a maturação *in vitro* nas células do cumulus. Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

Figura 48. Vias preditas como controladas pelos miRNAs que diminuem durante a MIV nas células do cumulus, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas reguladas pelos miRNAs que diminuem durante a maturação *in vitro* nas células do cumulus

Nas células do cumulus 17 miRNAs foram mais expressos grupo maturado *in vitro* do que *in vivo* (miR-let-7d, miR-let-7e, miR-127, miR-130b, miR-139, miR-208a, miR-296-3p, miR-363, miR-375, miR-488, miR-664b, miR-665, miR-761, miR-877, miR-9-5p, miR-105b e miR-708) (Figura 49). Esses miRNAs regulam principalmente: vias de junções aderentes, biossíntese de ácidos graxos, vias de sinalização Hippo, TGF-beta, estrógeno e foxO, de degradação de lisina, ciclo celular, endocitose, e biossíntese de glicosaminoglicanos (Figura 50).

Figura 49. Expressão relativa dos miRNAs mais expressos nas células do cumulus maturadas *in vitro* do que *in vivo*. Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

**miRNAs mais expressos nas células do cumulus
maturadas *in vitro* do que *in vivo***

Figura 50. Vias preditas como controladas pelos miRNAs mais expressos nas células do cumulus maturadas *in vitro* do que *in vivo*, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

De forma contrária, 8 miRNAs (miR-128, miR-183, miR-224, miR-224, miR-22-5p, miR-100, miR-27b, miR-342-3p e miR-505) tiveram a expressão aumentada nas células maturadas *in vivo* comparado às maturadas no sistema *in vitro* (Figura 51). Estes miRNAs modulam vias de junções aderentes, de sinalização Hippo e TGF-beta, biosíntese e metabolismo de ácidos graxos, degradação de lisina, processamento proteico do retículo endoplasmático, ciclo celular, adesão focal e regulação do citoesqueleto de actina (Figura 52).

Figura 51. Expressão relativa dos miRNAs mais expressos nas células do cumulus maturadas *in vivo* do que *in vitro*. Diferentes letras dentro do gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

Figura 52. Vias preditas como controladas pelos miRNAs mais expressos nas células do cumulus maturadas *in vivo* do que *in vitro*, organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias reguladas pelos miRNAs mais expressos nas células do cumulus maturadas *in vivo* do que *in vitro*

7.4.3.- Comparação do perfil de miRNAs dos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

Foi identificada a expressão de 294 miRNAs em blastocistos produzidos *in vitro* e 303 miRNAs no grupo *in vivo* (Figura 53). Dentre os miRNAs considerados como expressos 20 foram exclusivamente identificados no grupo *in vitro* e 29 no grupo *in vivo*. No total, 323 miRNAs foram identificados nos dois grupos. (Figura 53).

Figura 53. Diagrama de Venn demonstrando a distribuição dos miRNAs identificados nos blastocistos (BI) produzidos *in vivo* e *in vitro*

Tabela 8. Lista dos miRNAs expressos exclusivamente nos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

miRNAs exclusivos	
<i>In Vivo</i>	<i>In Vitro</i>
bta-miR-133c	bta-miR-133b
bta-miR-135a	bta-miR-134
bta-miR-133a	bta-miR-138
bta-miR-142-3p	bta-miR-140
bta-miR-142-5p	bta-miR-193a-3p
bta-miR-146a	bta-miR-202
bta-miR-150	bta-miR-301b
bta-miR-199a-3p	bta-miR-376e
bta-miR-199b	bta-miR-449c
bta-miR-200a	bta-miR-425-3p
bta-miR-224	bta-miR-450b
bta-miR-29d-5p	bta-miR-452
bta-miR-29e	bta-miR-432
bta-miR-299	bta-miR-496
bta-miR-32	bta-miR-485
bta-miR-335	bta-miR-545-3p
bta-miR-362-3p	bta-miR-545-5p
bta-miR-376a	bta-miR-877
bta-miR-363	bta-miR-1197
bta-miR-411c-5p	bta-miR-1301
bta-miR-431	
bta-miR-488	
bta-miR-490	
bta-miR-504	
bta-miR-495	
bta-miR-671	
bta-miR-873	
bta-miR-98	
bta-miR-935	

Os 29 miRNA exclusivos dos blastocistos *in vivo* mostraram modular vias importantes como a via de sinalização Hippo, de junções aderentes, via do FoxO, de biossíntese de esteroides, via de sinalização TGF-beta, do processo proteico do retículo endoplasmático, via de regulação do citoesqueleto da actina, de biossíntese de ácidos graxos, endocitose e a via de pluripotência (Figura 54).

Figura 54. Vias preditas como controladas pelos miRNAs expressos exclusivamente nos blastocistos produzidos *in vivo* organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados.

Vias preditas como reguladas pelos miRNAs exclusivos dos blastocistos produzidos *in vivo*

As vias de junções aderentes, síntese de ácidos graxos, do p53, interação receptor-ECM, vias de sinalização HIF-1, FoxO, Hippo, ErbB, ciclo celular e degradação de RNA podem estar modulados pelos miRNA exclusivos em blastocistos produzidos *in vitro* (Figura 55).

Figura 55. Vias preditas como controladas pelos miRNAs expressos exclusivamente nos blastocistos produzidos *in vitro* organizadas, à esquerda, pelo valor $-\log_{10}$ (valor de p) e, à direita, pelo número de genes regulados

Vias preditas como reguladas pelos miRNAs exclusivos dos blastocistos produzidos *in vitro*

Dentre os 274 miRNAs presentes nos grupos de blastocistos *in vivo* e *in vitro*, 10 apresentaram diferença estatística. Destes, seis miRNAs (miR-155, miR-296-3p, miR-302a, miR-302b, miR-500 e miR-940) estão elevados no grupo de blastocistos produzidos *in vitro* (Figura 56), enquanto quatro miRNAs (miR-96, miR-7a-3p, miR-205 e miR-449a) estão elevados no grupo de blastocistos produzidos *in vivo* (Figura 57).

Figura 56. Expressão relativa dos miRNA que aumentam nos embriões produzidos *in vivo* (A) e as vias preditas reguladas por eles (B).

Os miRNAs aumentados nos blastocistos produzidos *in vivo* modulam vias de síntese de ácidos graxos, via de sinalização TGF-beta, p3 e foxO, metabolismo dos ácidos graxos, junções aderentes, degradação de lisina e RNA e vias de sinalização de pluripotência e TNF (Figura 56).

Ainda, as vias de biosíntese de ácidos graxos, junções aderentes, ciclo celular, síntese de glicosaminoglicanos, via de sinalização Hippo, de interação receptor-ECM, adesão focal, via HIF-1, de transporte de RNA e via de regulação do citoesqueleto de actina são modulados por aqueles miRNAs aumentados nos embriões PIVE quando comparado ao sistema *in vivo* (Figura 57).

Com base nos resultados analisamos o padrão de expressão e distribuição destes 10 miRNAs diferentemente expressos através do Heatmap com agrupamento hierárquico e análise de componentes principais. Os resultados indicam maior similaridade do grupo de mórulas produzidas *in vivo* entre si, comparado ao grupo de mórulas produzidas *in vitro* (Figura 58). Os valores de expressão gênica estão apresentados no Apêndice S.

Figura 57. Expressão relativa dos miRNA que aumentam nos embriões produzidos *in vitro* (A) e as vias preditas reguladas por eles (B).

Figura 58. Heatmap com agrupamento hierárquico (A) e análise de componentes principais (B) dos valores de expressão representando os padrões de expressão e agrupamento das amostras e dos miRNAs estatisticamente diferentes expressos e identificados em embriões produzidos *in vitro* (BL IVT, em vermelho) e em *in vivo* (BL IVV, em verde).

8.- DISCUSSÃO

8.1.- Estudo 1: “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”.

A PIVE é uma das biotecnologias mais utilizadas na pecuária bovina. A comunidade científica tem se focado no incremento da qualidade embrionária e nas taxas de sucesso. No entanto, apesar de todos os esforços para entender como o sistema *in vitro* influencia no desenvolvimento oocitário e embrionário, a PIVE ainda está aquém dos resultados obtidos em condições *in vivo*. Além disso, as limitações impostas pelo próprio sistema *in vitro*, como a tensão de oxigênio, manipulação de gametas e embriões e o meio de cultivo, são muitas vezes ignoradas em nome da praticidade. Como consequência, o desenvolvimento embrionário na PIVE tende a se desviar da normalidade. Ainda hoje não é claro qual a real influência da maturação *in vitro* oocitária nas alterações encontradas nos embriões obtidos por essa técnica. Este estudo teve como objetivo avaliar como a MIV afeta o metabolismo e homeostase celular no complexo COC.

Apesar de estudos anteriores demonstrarem uma diminuição do conteúdo lipídico durante a MIV (Ferguson e Leese, 1999; Kim *et al.*, 2001), os dados obtidos no presente trabalho revelam um aumento dos DAG e TAG tanto nos oócitos quanto nas células do cumulus submetidos ao sistema *in vitro*, o que, interessante, não foi observado durante a maturação *in vivo*. Esses resultados estão em concordância com os achados de outros grupos onde verificou-se um aumento lipídico oocitário, inclusive em casos em que a MIV foi realizada sem a presença de SFB no meio de cultivo (Aardema *et al.*, 2011; Del Collado *et al.*, 2015). Além disso, o cultivo *in vitro* modificou os padrões de MAG, DAG e TAG dentro do COC.

Sabe-se que diferentes ácidos graxos podem ser benéficos ou prejudiciais na maturação (McKeegan e Sturmey, 2011), indicando uma possível influência dos ácidos graxos na qualidade oocitária durante a MIV. Como exemplo, altas concentrações dos ácidos palmítico (16:0) e linolênico (18:3) mostraram causar efeitos negativos na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (Leroy *et al.*, 2005; Marei *et al.*, 2009). Estes dois ácidos graxos estão presentes em maior concentração nos oócitos maturados *in vitro* quando comparado aos *in vivo*, o que consequentemente indica um

aumento destes ácidos graxos quando comparado à condição fisiológica. Sendo assim, efeitos prejudiciais resultantes da presença destes ácidos graxos podem ocorrer durante a MIV.

Além do aumento da quantidade lipídica, foram observados aumentos na expressão dos genes relacionados com síntese e acúmulo lipídico nas células do cumulus maturadas *in vitro*, demonstrando que essas vias estão sendo ativadas em maior intensidade quando comparadas às células provenientes de COC maturados *in vivo*. Os dados aqui apresentados confirmam a hipótese de que, durante a MIV, ocorre um aumento da síntese lipídica nas células do cumulus. Genes relacionados com dessaturação e alongação de ácidos graxos também foram influenciados pelo sistema *in vitro*, resultados esses que foram confirmados pelas análises de espectrometria de massas, onde foi observado que a maioria dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa estavam aumentados nas células do cumulus após a MIV.

Os resultados aqui obtidos indicam que a MIV provoca uma diminuição da beta-oxidação e um aumento da via glicolítica dentro do COC. Ademais, os resultados da razão ATP/ADP demonstraram que oócitos maturados *in vitro* possuem menor atividade mitocondrial e menor metabolismo oxidativo em relação àqueles originários do processo *in vivo*. Baixos níveis de ATP/ADP estão correlacionados com o aumento da glicólise e diminuição da atividade mitocondrial (Maldonado e Lemasters, 2014). Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos nas análises de expressão gênica, onde genes relacionados com o metabolismo da glicose (*G6PD*, *PFKP* e *PGK1*) apresentaram um aumento no número de transcritos. Além disso, o gene relacionado com β -oxidação com maior expressão em células do cumulus, *CPT1A*, estava significativamente menos expresso no grupo *in vitro* em relação às células maturadas *in vivo*. O incremento da via glicolítica durante a MIV pode ser consequência do déficit da β -oxidação, o que pode ter levado a uma forma alternativa de fornecimento energético. Especificamente, a diferença de expressão entre as isoformas da CPT1, *CPT1A* e *CPT1B* entre a maturação *in vivo* e *in vitro* nas células do cumulus nos leva a pensar em uma possível influência pré-transcricional do gene *CPT1A* durante a MIV.

Para testar essa hipótese, foram realizadas análises dos níveis de metilação de citosinas (sítios CpG) pela técnica de conversão de citosinas metiladas por

bissulfito de sódio. No entanto, nenhuma diferença foi observada nos níveis de metilação de citosinas da região promotora do *CPT1A* entre as células do cumulus maturadas *in vivo* e *in vitro*. Isto sugere a ocorrência de algum outro mecanismo envolvido na regulação da transcrição deste gene.

Assim sendo, a diminuição da atividade mitocondrial encontrada neste trabalho pode estar, em parte, envolvida no acúmulo lipídico observado durante a MIV. Resultados similares foram encontrados em oócitos de camundongos, em que os obtidos por maturação *in vivo* mostraram maiores níveis de atividade mitocondrial comparado aos maturados *in vitro* (Zeng *et al.*, 2014). Outros estudos também demonstraram menores níveis de β -oxidação nas células do cumulus maturadas *in vitro* (Dunning *et al.*, 2010; Dunning *et al.*, 2014), o que corrobora nossos resultados de expressão gênica e quantificação de ATP e ADP.

Considerando o aumento da atividade mitocondrial nos oócitos do sistema *in vivo*, o aumento nos níveis de EROs observados neste estudo estava dentro do esperado. No entanto, a quantidade de GSH, que constitui o antioxidante mais abundante em oócitos e embriões, apresentou níveis muito superiores durante a maturação *in vivo* quando comparado à MIV. Os oócitos devem estabelecer o estoque de GSH durante a maturação, já que após esta fase, a síntese somente é retomada após a ativação do genoma embrionário (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2011). Este resultado sugere um aumento na susceptibilidade a danos oxidativos durante a PIVE.

As células do cumulus submetidas ao sistema *in vitro* mostraram níveis de transcritos maiores para os genes *BAX*, *BCL2* e *CASP3* comparado àquelas do sistema *in vivo*, indicando um aumento de atividade da via de apoptose. Apesar de as células provenientes de COCs da MIV terem apresentado maiores níveis de mRNA do gene *SOD1*, os níveis de *NRF2* e *PRDX1* foram menores quando comparados aos observados em células provenientes de maturação *in vivo*. Especificamente, sabe-se que a via ativada pelo fator de transcrição *NRF2* é uma das mais importantes vias antioxidantes. Este fator foi associado com a sobrevivência e competência para o desenvolvimento dos embriões cultivados sobre condições de estresse oxidativo (Amin *et al.*, 2014). Por isso, os resultados apresentados aqui indicam que a MIV leva a um aumento do estresse celular sem que haja necessariamente um aumento da atividade das vias antioxidantes.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo avaliando a expressão de miRNAs relacionados com metabolismo e estresse celular entre a maturação *in vivo* e *in vitro*. Sendo que, dos 88 miRNAs investigados nos oócitos, seis diferiram durante a maturação e, apenas dois, bta-miR-17-5p e bta-miR-106b, mostraram-se diferentemente expressos entre os oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, não parece que a regulação pós-transcricional mediada por miRNAs seja responsável pelas diferenças observadas no metabolismo oocitário.

A expressão dos mRNAs e miRNAs nas células do cumulus mostraram regulações nas vias lipogênicas, com vários componentes destas vias sendo influenciados pelo sistema *in vitro*. Em particular, os genes de elongação de ácidos graxos, *ACSL3* e *ACSL6* apresentaram diferentes níveis de transcritos entre as maturações. O miRNA-200c é predito regular o gene *JUN*, que por sua vez, leva ao aumento dos níveis do SREBP1 (Guo *et al.*, 2016). A diminuição da expressão do miR-200c nas células do cumulus maturadas *in vitro* poderia levar a um aumento de expressão do gene *SREBP1* e, por consequência, um incremento nos níveis de *FASN* e *TAG*. Ademais, os miR-182 e miR-96 que diminuíram nas células do cumulus durante a MIV são preditos como reguladores da expressão do *FBW7* e *INSIG2*, que regulam negativamente a síntese do SREBP1 (Jeon *et al.*, 2013). Apesar desses mecanismos estarem descritos unicamente em humanos e camundongos, é provável que sejam conservados em bovinos, segundo o software TargetScan. Assim sendo, mudanças nos níveis dos miR-200c, miR-182 e miR-96 na mesma célula podem controlar a síntese de SREBP1, que no presente trabalho apresentou maiores níveis de transcritos nas células do cumulus MIV.

O acúmulo celular de certos ácidos graxos de cadeia longa, como o palmitato, leva a efeitos prejudiciais na mitocôndria e no RE, induzindo o estresse do RE e levando à apoptose celular (Borradaile *et al.*, 2006; Diakogiannaki *et al.*, 2008). Foi demonstrado que oócitos humanos e murinos com excessivo acúmulo lipídico possuem maiores níveis dos marcadores de estresse do RE (Wu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). Os resultados aqui apresentados demonstram que a MIV provoca um aumento de lipídeos em todo o complexo cumulus-oócito, majoritariamente em ácidos graxos de cadeia longa, o que provocaria um aumento do estresse nestas células. Os resultados também suportam a ideia de que o aumento do acúmulo lipídico

consequente da MIV e a diminuição da β -oxidação, combinado com o estresse oxidativo, podem levar ao estresse do RE e à apoptose celular.

Portanto, este trabalho demonstra que a MIV gera COCs metabolicamente desregulados e estressados. Ainda, o sistema *in vitro* causou o aumento do metabolismo da glicose, de síntese e acúmulo lipídico, além da diminuição da ativação da via de β -oxidação, e aumento do estresse celular. Os mecanismos que levaram aos eventos celulares estão sumarizados na Figura 59. Os resultados sobre metabolismo energético e estresse mostrados nos oócitos obtidos por MIV podem ser comparados com os oócitos recuperados de mulheres obesas ou com a síndrome metabólica. Oócitos provenientes destas pacientes exibem baixa qualidade associada com o desenvolvimento embrionário comprometido e com modificações na reprogramação metabólica fetal (Heerwagen *et al.*, 2010; Cardozo *et al.*, 2011; Jungheim *et al.*, 2011). Interessantemente, os resultados obtidos nos COCs submetidos à MIV neste trabalho se assemelham aos encontrados neste tipo de distúrbio.

Em conclusão, este estudo proporciona evidências a respeito das modificações relacionadas com metabolismo e estresse celular durante a maturação *in vitro* em bovinos. Estes resultados ressaltam a necessidade de maiores estudos para elucidar os motivos pelos quais os oócitos e embriões produzidos *in vitro* possuem menor qualidade em relação àqueles obtidos a partir do sistema *in vivo*.

Figura 59 Esquema das alterações causadas pela MIV no metabolismo e estresse celular nas células do cumulus e oócitos. A hipótese central do trabalho foi que a maturação *in vitro* provoca um aumento da síntese e acúmulo lipídico, causando o estresse celular no complexo cumulus-oócito. Nesta figura estão representados os resultados mais importantes que suportam essa hipótese: nas células do cumulus, além de ocorrer aumento dos lipídeos neutros, os resultados dos níveis de expressão mRNA (*SREBP1*, *FASN* e *PLIN2*) e miRNA (miR-96 e miR-182) sugerem o aumento da via de síntese e acúmulo de lipídeos nas células do cumulus maturadas *in vitro*. Além disso, houve um aumento na expressão dos genes relacionados com estresse (*CASP3*, *BCL2* e *BAX*) e glicólise (*G6PD*, *PKFP* e *PGK1*), e diminuição de um dos antioxidantes mais importantes (*NRF2*) nas células da MIV. Nos oócitos, foi verificado aumento dos lipídeos e diminuição dos níveis de GSH e a razão ATP/ADP no oócitos maturados *in vitro*. LD = gota lipídica, TAC = ciclo do ácido tricarboxílico, ETC = cadeia de transporte de elétrons, ARE = elemento a resposta antioxidante, ER = retículo endoplasmático, ROS = espécies reativas de oxigênio.

8.2.- Estudo 2: “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3* - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”

O aumento do acúmulo lipídico durante a PIVE e a baixa criotolerância embrionária estão entre as maiores desvantagens desta biotecnologia (Rizos, Ward, *et al.*, 2002; Seidel, 2006). Foi demonstrado que em algumas espécies, como a bovina e a murina, esse acúmulo já acontece durante a MIV quando há exposição dos gametas a ambientes não fisiológicos (Yang *et al.*, 2010; Del Collado *et al.*, 2016). No presente trabalho, foi proposto que o acúmulo lipídico oocitário que ocorre na MIV é mediado pela desregulação do transporte de ácidos graxos pela proteína carregadora FABP3 através das TZPs. Desse modo, foi constatado que o sistema *in vitro* provoca aumento nos níveis de FABP3 nas células do cumulus. Quando comparados os COC imaturos com os maturados *in vitro* por 9 e por 18 horas, verificou-se a presença da FABP3 dentro das TZPs, assim como o aumento concomitante da FABP3 e dos lipídeos intracitoplasmáticos no oócito durante as primeiras 9 horas de MIV. Por último, foi observado que a interrupção das TZPs durante as primeiras 9 horas da MIV provoca diminuição lipídica. Assim, estes resultados demonstram, pela primeira vez, um provável transporte de ácidos graxos das células do cumulus para o oócito, que pode ser responsável pelo acúmulo lipídico oocitário durante a MIV.

O transporte lipídico do meio do cultivo para a célula durante o sistema *in vitro* tem sido amplamente estudado (Ferguson e Leese, 1999; Abe *et al.*, 2002; Del Collado *et al.*, 2016) como possível causa do acúmulo lipídico durante a PIVE. Muitos estudos têm constatado que embriões cultivados em meios contendo SFB adquirem mais lipídeos e são menos criotolerantes que aqueles cultivados na ausência do soro (Ferguson e Leese, 1999; Abe *et al.*, 2002; Rizos, 2002). Baseado nisso, tem sido bem estabelecida uma correlação entre o conteúdo lipídico do meio de maturação com os níveis lipídicos dos oócitos. No entanto, o mecanismo mediante o qual este transporte acontece dentro do COC nunca foi identificado e permanece desconhecido.

Neste estudo foi observada a localização da FABP3 nas TZPs durante a MIV, sugerindo que moléculas de FABP3 provenientes das células do cumulus poderiam transportar ácidos graxos destas células para o oócito. As TZPs, antigamente

conhecidas como *cumulus cells process endings* (CCPEs) (De Loos *et al.*, 1989; De Loos *et al.*, 1991), são capazes de transportar até o oócito moléculas com o peso molecular menores de 1 kDa mediante as junções comunicantes localizadas no final dessas projeções (Kruip *et al.*, 1983; Simon e Goodenough, 1998) ou, como recentemente proposto, mediante o tráfico de vesículas extracelulares na fenda encontrada entre as TZPs e o oolema oocitário (Albertini *et al.*, 2001; Macaulay *et al.*, 2014). Sabendo que o peso molecular da FABP3 é superior a 1 kDa, o transporte mediante vesículas parece ser o mecanismo mais razoável. Esta suposição é respaldada por relatos que mostram o transporte de moléculas grandes, como mRNA, das células do cumulus para o oócito, mediante TZPs (Macaulay *et al.*, 2014; Macaulay *et al.*, 2016). Além disso, foi descrita a presença de várias FABPs, como a FABP3, FABP4 e FABP5, dentro de vesículas extracelulares em diferentes fluidos corporais (Subra *et al.*, 2010; Kalra *et al.*, 2012; Kralisch *et al.*, 2014; Hotamisligil e Bernlohr, 2015a; Hurwitz *et al.*, 2016; Fujita *et al.*, 2017). Já que a presença de vesículas foi observada no espaço entre as TZPs e o ooplasma (Macaulay *et al.*, 2014), é razoável pensar na hipótese de que o transporte de FABP3 das células do cumulus para o oócito seja por intermédio de vesículas extracelulares.

A família das proteínas FABP tem sido associada ao transporte intracelular de ácidos graxos, majoritariamente até a mitocôndria, para ocorrer a β -oxidação. No entanto, recentemente, foi descoberta a função extracelular de carregar lipídeos entre tecidos (Iso *et al.*, 2013). Ainda, estudos verificaram alterações na presença de FABPs extracelulares em doenças metabólicas (Haider *et al.*, 2007; Haluzik *et al.*, 2009; Karakas *et al.*, 2009; Subra *et al.*, 2010; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Diaz *et al.*, 2015; Hotamisligil e Bernlohr, 2015b). A FABP cardíaca, também conhecido como H-FABP ou FABP3, foi primeiramente identificada em tecidos reprodutivos como ovário e placenta com funções intra e extracelular (Furuhashi e Hotamisligil, 2008; Hotamisligil e Bernlohr, 2015a). Baseado na literatura, apenas a FABP3 e a FABP5 são presentes nos COCs, e somente a FABP3 aumenta durante a MIV, sugerindo um possível papel de transporte (Charlier *et al.*, 2012; Sanchez-Lazo *et al.*, 2014).

Expor células musculares a altas concentrações de ácidos graxos em ambientes *in vitro* e *in vivo*, induz a expressão da FABP3 (Veerkamp e Vanmoerkerk,

1993; Zanotti, 1999). Como houve um aumento de lipídeos nos COCs decidimos verificar se os níveis de FABP3 estavam alterados após a MIV. E demonstramos o aumento nos conteúdos de transcritos e da proteína nas células do cumulus submetidas ao sistema *in vitro*. Também foi observado o aumento lipídico oocitário após o cultivo *in vitro*, sugerindo que a FABP3 possa estar envolvida no transporte extracelular de ácidos graxos, e não possuir função unicamente intracelular. Interessantemente, as células do cumulus maturadas *in vivo* não mostraram aumento algum nos níveis de FABP3 comparado às células do cumulus imaturas, indicando que o sistema *in vitro* pode estar alterando o transporte lipídico. Contudo, os resultados deste trabalho sugerem que o mecanismo pelo qual os oócitos acumulam mais lipídeos durante a MIV deve ser mediado pela FABP3.

Nos resultados obtidos na imunolocalização foi verificada uma relação entre a FABP3 e os conteúdos lipídicos nos oócitos durante os estágios iniciais da MIV, sendo observada a colocalização da FABP3 e das TZPs durante as primeiras 9 horas da MIV. Assim sendo, o aumento concomitante dos níveis de FABP3 e lipídeos observado neste estudo pode ser causado pelo transporte dos lipídeos por esta proteína pelas TZPs. Também constatamos que após 18 horas da MIV, o número de TZPs perto do ooplasma diminui drasticamente, e que as moléculas de FABP3 localizavam-se na parte terminal das projeções. Como as FABP3 migraram unicamente até a parte final das TZPs, acumulando-se nelas, sugere que o transporte aconteça em uma única direção, das células do cumulus para o oócito, e não na direção oposta. Interessantemente, os níveis de FABP3 e lipídeos nos oócitos mantiveram-se constantes entre as 9 até as 18 horas da MIV. Assim, o aumento de FABP3 e de lipídeos parece ser dependente da presença de TZPs ativas.

A necessidade de TZPs funcionais que permitam o acúmulo lipídico oocitário é suportado pela literatura. A exposição a altos níveis de ácidos graxos durante as últimas 6 horas da MIV (considerando-se uma MIV de 23 horas) resultou em acúmulo lipídico nas células do cumulus, mas não no oócito (Aardema *et al.*, 2013). No momento que as TZPs não são mais funcionais, o transporte de lipídeos das células do cumulus para o oócito parece ser interrompido. Demonstrou-se portanto o aumento lipídico nas células do cumulus após a exposição dos COCs a um ambiente rico em lipídeos (Aardema *et al.*, 2013); no entanto, nosso trabalho evidenciou o possível transporte de ácidos graxos das células do cumulus para o oócito durante a MIV.

Com o intuito de verificar até que ponto as TZPs estão envolvidas no transporte de ácidos graxos das células do cumulus para o oócito, as TZPs foram interrompidas utilizando citocalasina B durante as primeiras 9 horas da MIV. Primeiramente, foi observada a perda da maioria das TZPs após a exposição à citocalasina-B e, a ausência da FABP3 na zona pelúcida. Portanto, o tratamento foi capaz de interromper as TZPs, bloqueando o transporte de FABP3. Além disso, verificou-se diminuição do conteúdo lipídico oocitário nos oócitos que sofreram a ação da citocalasina-B quando comparados aos oócitos controle. Consequentemente, a interrupção das TZPs, comprometendo o transporte de ácidos graxos das células do cumulus para o oócito, provocou a diminuição do acúmulo lipídico citoplasmático, suportando a nossa hipótese principal.

Os resultados obtidos neste estudo trouxeram novos conhecimentos sobre os efeitos do sistema *in vitro* sob os gametas. O motivo pelo qual a MIV provoca acúmulo de lipídeos e de FABP3 ainda não é completamente elucidado. O ambiente com alto conteúdo lipídico parece não ser o responsável, como previamente discutido (Del Collado *et al.*, 2016). A desregulação metabólica das células do cumulus, incluindo a alteração do metabolismo energético e a síntese de triacilgliceróis, é a causa mais provável para esse acúmulo acontecer (conforme demonstrado no estudo 1).

O presente estudo também pode gerar novos enfoques aos estudos de infertilidade em mulheres obesas e com distúrbios metabólicos. É bem conhecido que mulheres acima do peso ou que possuem algum tipo de desordem metabólica sofrem de diversos problemas de fertilidade associados ao alto conteúdo lipídico do sangue, fluido folicular e oocitário. Foi descrito que altos conteúdos lipídicos nos COCs provocam estresse do retículo endoplasmático e consequentemente apoptose causada pela resposta à lipotoxicidade, provocando o decréscimo nas taxas de fertilidade em mulheres obesas (Robker *et al.*, 2009; Robker *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). No entanto, o mecanismo atrás deste acúmulo continua desconhecido. Estudos recentes tem identificado altos níveis de FABP4 no sangue e tecidos de pacientes com obesidade (Hotamisligil e Bernlohr, 2015a). Da mesma forma, constatou-se altos níveis de FABP3 em pacientes com a síndrome metabólica (Akbal *et al.*, 2009). A frequência desse tipo de condição aumenta perigosamente entre as mulheres, sendo um dos maiores problemas de fertilidade já descritos, e cujo mecanismo molecular determinante dessa infertilidade segue indefinido.

Os resultados aqui expostos demonstram a dependência da comunicação cumulus-oócito para a ocorrência do acúmulo lipídico. Também se sugere que o possível mecanismo de transporte de ácidos graxos entre as células do cumulus e o oócito seja via FABP3 e TZPs. Foi verificada a desregulação da síntese e acúmulo da FABP3 concomitantemente ao acúmulo lipídico durante a MIV. Pode se especular também que o aumento dos lipídeos nas células do cumulus maturadas *in vitro* possa provocar o aumento nos níveis de expressão da FABP3 com intuito de transportar esses ácidos graxos. Desse modo, essa desregulação nas células do cumulus poderia levar ao acúmulo encontrado nos oócitos após a MIV. Experimentos adicionais são necessários para verificar este novo mecanismo de acúmulo lipídico oocitário. Os dados aqui apresentados sugerem o transporte de ácidos graxos mediante FABP3 e TZPs dentro do COC e o importante papel que a FABP3 pode ter nos problemas de fertilidade. Finalmente, o melhor entendimento deste mecanismo de transporte pode ajudar a desenvolver ferramentas que modulem o acúmulo lipídico nos oócitos maturados *in vitro*, podendo ter enormes implicações nas tecnologias de reprodução assistida em animais e humanos e nos tratamentos de mulheres com distúrbios metabólicos.

8.3.- Estudo 3: “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*”

O presente trabalho permitiu estudar e comparar os embriões produzidos *in vivo* com aqueles produzidos *in vitro*. A condição de cultivo *in vitro* utilizada consistiu em uma tensão de oxigênio mais fisiológica, 5%, e sem o acréscimo de SFB. Foi verificado um aumento do conteúdo lipídico e de EROs nos embriões produzidos *in vitro* quando comparado com os produzidos *in vivo*. No entanto, esse fenótipo não foi acompanhado por modificações correspondentes na expressão gênica embrionária. Apenas os genes marcadores de estresse celular *GRP78* e *CHOP10* estavam aumentados nos blastocistos da PIVE, sendo que não obtivemos diferenças nas expressões dos outros genes relacionados com estresse celular ou metabolismo lipídico.

O excessivo acúmulo lipídico embrionário na PIVE tem sido relacionado ao uso do SFB durante o CIV (Sata *et al.*, 1999; Rizos, 2002). No entanto, no nosso trabalho

o soro unicamente foi utilizado na MIV, e o CIV foi realizado em ausência do mesmo. Observou-se aumento do conteúdo lipídico nos embriões produzidos *in vitro* quando comparado aos *in vivo*. Isto pode ter acontecido em consequência do acúmulo que acontece durante MIV (Del Collado *et al.*, 2016) ou por acúmulos provenientes da síntese de lipídeos durante o cultivo *in vitro*. De qualquer modo, descarta-se que a entrada de lipídeos a partir do meio até o embrião durante o CIV seja a causa do aumento, sendo que o CIV foi realizado unicamente com BSA livre de ácidos graxos.

Já foi descrito que embriões cultivados em baixa tensão de oxigênio, 5%, são menos estressados, possuem menor quantidade de EROs e levam a melhores taxas de prenhez que aqueles produzidos em alta tensão de oxigênio (Dumoulin *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2014). Aqui, mostrou-se que, mesmo utilizando o sistema de 5% de O₂, existe um aumento das EROs nos embriões quando comparado ao sistema *in vivo*, indicando que há elevação no estresse celular nesta condição. Esse estresse oxidativo poderia ser consequência da manipulação dos gametas e embriões, do ambiente não fisiológico ao que o embrião está submetido, ou ainda por reflexo da MIV. No Estudo 1 verificamos que oócitos cultivados *in vitro* possuem menores níveis de GSH que aqueles produzidos *in vivo*, fazendo-os mais susceptíveis ao estresse. Existe a possibilidade de que o estoque de GSH gerado durante a MIV não tenha sido capaz de neutralizar as EROs, levando ao seu aumento. Além disso, foi constatada maior expressão de genes indicadores de estresse do RE como o *GRP78* e *CHOP10* nos embriões produzidos *in vitro*. Os resultados de elevação de EROs em embriões PIVE, bem como de diminuição da *GPX1*, um gene da família da Glutathione Peroxidase, associado à elevação da expressão do *GRP78* e *CHOP10*, demonstram desbalanço na homeostase celular nos embriões PIVE na fase de blastocisto.

De forma oposta, o fenótipo encontrado nos embriões produzidos *in vitro* de aumento do conteúdo lipídico não encontra paralelo evidente nos padrões de expressão gênica. Não se pode descartar, todavia, que o acúmulo lipídico embrionário visto na fase de blastocisto possa ter origem em fases anteriores do desenvolvimento embrionário ou mesmo durante a maturação *in vitro*. A não correspondência entre o fenótipo embrionário de excesso lipídico e estresse pode ser devido a ajustes no padrão transcricional. Pesquisas demonstraram como a ativação do genoma embrionário muda drasticamente o transcriptoma embrionário (Kues *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014), isso faz acreditar que possa existir uma correção

compensatória de alterações provenientes de fases anteriores à essa ativação. Outra possibilidade está na seleção negativa de embriões com alterações severas de metabolismo e homeostase, que falham em atingir a fase de blastocisto.

Desse modo, nossos dados demonstram que, mesmo utilizando condições mais fisiológicas de PIVE, como CIV sem SFB e em baixa tensão de oxigênio, estabelecem-se alterações no metabolismo lipídico e estresse celular dos embriões resultantes. Maiores estudos precisam ser realizados para entender as alterações produzidas ao longo da PIVE, ressaltando ainda, que os resultados apresentados no Estudo 1 demonstram uma maior desregulação metabólica e da homeostase celular durante a maturação oocitária do que na fase de blastocisto.

8.4.- Estudo 4: “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”

A importância dos miRNAs na maturação e desenvolvimento embrionário tem ganhado importância nos últimos anos (Hossain *et al.*, 2012; Abd El Naby *et al.*, 2013). No entanto, ainda se desconhece o impacto da PIVE na expressão desses pequenos RNAs e das vias reguladas por estes. Neste estudo apresentamos diferenças na expressão de miRNAs e das vias reguladas por eles desde a maturação oocitária até a formação do blastocisto.

Observando em conjunto os miRNAs que foram exclusivos de cada grupo nos oócitos, verificamos que as vias mais reguladas são vias de extrema importância para a maturação, como as vias de sinalização TGF-beta e Hippo, vias metabólicas e vias relacionadas com junções aderentes. Os miRNAs exclusivos nos oócitos imaturos mostraram regular majoritariamente as vias do TGF-beta, pluripotência e junções aderentes. Como mencionado anteriormente, a família dos fatores de crescimento TGF-beta, entre eles o BMP15 e GDF9, são de extrema importância na maturação oocitária por serem secretados pelo oócito e por ter a função de modular a diferenciação das células do cumulus (Dong *et al.*, 1996; Galloway *et al.*, 2000; Eppig *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2006). De fato, pesquisas vem demonstrando a importância desses fatores na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, aumentando a expansão das células do cumulus e as taxas de blastocisto (Dragovic *et al.*, 2005; Hussein *et al.*, 2006). Essa via parece estar menos regulada pelos miRNAs exclusivos

dos oócitos maduros (*in vivo* e *in vitro*), porém, mostrou estar muito regulada por miRNAs oocitários em geral.

Também já foi demonstrada a importância do transporte entre células do cumulus e oócitos, então é de se esperar que a via de junções aderentes seja uma das mais reguladas nos miRNAs exclusivos dos três grupos. A via de sinalização Hippo foi uma das mais reguladas pelos miRNAs exclusivos dos oócitos maduros (*in vivo* e *in vitro*). Uma vez que a via Hippo deve ser suprimida para que ocorra o desenvolvimento de folículos pré-antrais até antrais (Hsueh *et al.*, 2015), espera-se que esta via esteja mais regulada em oócitos maduros. É possível que este seja o motivo pelo qual em oócitos imaturos provenientes de folículos de 2 a 8 mm esta via não se mostrou tão regulada. Outro dado surpreendente foi que a via mais regulada pelos miRNAs exclusivos da maturação *in vivo*, apesar de apresentar modulação de poucos genes, foi a de biossíntese de ácidos graxos. Como discutido nos Estudos 1 e 2 e como indicado pela literatura (Del Collado *et al.*, 2016), oócitos maturados *in vivo* possuem menores níveis de lipídeos quando comparados com aqueles da MIV. Esses resultados demonstram que, talvez, os miRNAs estejam modulando mais eficientemente esta via no processo *in vivo*.

O miR-210, que apresentou maiores níveis de expressão durante a maturação *in vivo* nos oócitos, mas não foi identificado nos oócitos maturados *in vitro*, tem sido relacionado com a hipóxia (Giannakakis *et al.*, 2008). Esse miRNA estava mais expresso em embriões cultivados em baixa tensão de oxigênio, quando comparado com os cultivados em alta tensão, e foi denominado biomarcador molecular não invasivo para o estado de normóxia (Bomfim, 2017). Esses resultados corroboram os achados deste estudo, sendo que unicamente os oócitos maturados *in vivo* expressaram esse miRNA.

O único miRNA que mostrou maior expressão nos oócitos maturados *in vivo*, quando comparado aos *in vitro*, foi o miRNA-451. Este miRNA está relacionado com a modulação das vias PI3K/AKT e AMPK/mTOR (Li *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). Estas vias são importantes para o recrutamento folicular inicial (Hsueh *et al.*, 2015), no entanto não está claro o papel delas durante a maturação oocitária final. Alguns autores já mostraram que a via PI3k/Akt está envolvida com a reativação da meiose oocitária, além de também estar relacionada com a expansão das células do cumulus

(Hoshino *et al.*, 2004). Sendo assim, não fica claro porque este miRNA está aumentado no grupo *in vivo* em relação ao grupo *in vitro*, porém sugere que se trata de um miRNA importante, uma vez que foi o único com expressão aumentada neste grupo.

Dois miRNAs (miR-155 e miR-21-5p) apresentaram aumento de expressão unicamente nos oócitos maturados *in vitro*. As vias mais reguladas por estes miRNAs são relacionados com alongação de ácidos graxos e vias de sinalização TGF-beta e FoxO. Como verificamos no estudo 1, os oócitos maturados *in vitro* possuem maiores níveis de ácidos graxos de cadeia longa. O aumento destes dois miRNAs pode representar a ação de algum mecanismo celular para reverter essa situação, inibindo a via da alongação. A possível supressão da via TGF-beta por parte desses dois miRNAs nos oócitos maturados *in vitro* poderia indicar uma falha na sinalização parácrina dos fatores BMP15 e GDF9 durante a MIV.

Os 4 miRNAs cuja expressão diminuiu ao longo da maturação *in vivo*, e não durante a MIV, são responsáveis pela regulação de vias de ácidos graxos e junções aderentes. Esses achados têm sentido sendo que se espera que os ácidos graxos se mantenham em baixos níveis e que as comunicações celulares diminuam após a reativação da meiose oocitária, o que de fato foi observado nos resultados dos Estudos 1 e 2, além de outros estudos presentes na literatura (Macaulay *et al.*, 2014; Del Collado *et al.*, 2016)

Interessantemente, e diferentemente do que foi observado no oócito, as vias celulares dentro das células do cumulus parecem estar mais moduladas por miRNAs, mostrando mais diferenças entre os grupos do que nos oócitos. Sobre os miRNAs exclusivos de cada grupo, as vias mais reguladas no grupo imaturo são a do TGF-beta, ciclo celular e FoxO. Nas células do cumulus maturadas *in vitro* e *in vivo* a via Hippo aparece como uma das mais reguladas. Como falado anteriormente, esta é uma via que regula o recrutamento folicular inicial, por isso, espera-se que esta esteja mais suprimida após a maturação. Também vale ressaltar que a segunda via mais regulada nas células do cumulus maturadas *in vivo* foi a de biossíntese de ácidos graxos, o que corrobora os resultados observados nos Estudos 1 e 2 onde foram observados menores conteúdos lipídicos nas células após a maturação *in vivo* quando comparada a MIV.

Em relação aos miRNAs que diferiram durante as maturações *in vivo* e *in vitro* nas células do cumulus, podemos observar que as diferenças não se encontram em quais vias foram reguladas, mas sim na intensidade de modulação destas vias. Independentemente se forem miRNAs aumentados num grupo ou no outro, ou com diferentes dinâmicas dentro das diferentes maturações, podemos observar que sempre as mesmas vias foram moduladas. Estas vias são majoritariamente vias relacionadas com junções aderentes e comunicação celular, vias de sinalização como a TGF-beta, FoxO e Hippo, e vias metabólicas. Interessantemente, nas células do cumulus foram observados um maior número de miRNAs modulando o metabolismo celular. Estas vias são relacionadas principalmente com biossíntese e metabolismo de ácidos graxos e degradação da lisina, e foram observadas na maioria dos grupos, independentemente do comportamento dos miRNAs dentro das maturações. Tanto o metabolismo dos ácidos graxos, quanto a degradação da lisina, nos conduzem a um mesmo mecanismo celular; o ciclo de Krebs, ou CAT. Os miRNAs nas células do cumulus parecem ter um papel maior de regulação do metabolismo energético do que no oócito. Estes resultados estão em acordo com os observados nos Estudos 1 e 2, onde indicamos que a desregulação metabólica nas células do cumulus é maior que no oócito e que isto pode ter consequências no oócito.

Sobre os miRNAs expressos nos blastocistos produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, observamos que as vias mais moduladas por estes são as de junções aderentes e biossíntese de ácidos graxos. Ainda, a via de sinalização Hippo parece ser a mais regulada pelos miRNAs exclusivos nos blastocistos produzidos *in vivo*. Essa via possui grande importância na polarização celular durante o desenvolvimento para a formação do trofoblasto (TE) e massa celular interna (MCI) (Hirate *et al.*, 2013; Anani *et al.*, 2014). Como esta via parece estar mais modulada por miRNAs no sistema *in vivo* em relação ao sistema *in vitro*, essa diferença pode prejudicar a formação do blastocisto durante a PIVE. A via das junções aderentes aparece em todos os grupos, intensamente regulada. As junções aderentes, compostas por actinas, caderinas e integrinas, são importantes na comunicação entre as células, sendo que estudos anteriores já descreveram este tipo de comunicação celular no TE e MCI (Magnuson *et al.*, 1977). Assim sendo, percebe-se que os miRNAs são responsáveis pela regulação da comunicação celular não somente durante a maturação, mas também ao longo do desenvolvimento.

Como também aconteceu durante a maturação, a via de biossíntese de ácidos graxos mostrou-se muito regulada por miRNAs nos blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*. Esses achados, junto com os encontrados no Estudo 1 e 3, aumentam as suspeitas de que existe uma regulação pós-transcricional mediada por miRNAs na expressão de vias relacionadas ao metabolismo lipídico durante a maturação e desenvolvimento embrionário inicial.

Outra via moderadamente regulada pelos miRNAs exclusivos ou aumentados nos blastocistos *in vivo* foi a via de sinalização da TGF-beta. Moléculas da família da TGF-beta estão presentes na maioria das células até a formação de blastocisto (Paria *et al.*, 1992), no entanto se conhece muito melhor a função deles durante a diferenciação embrionária e a fase de pós-implantação em comparação com a fase de desenvolvimento embrionário inicial. A família TGF-beta está envolvida na denominada transição epitelial-mesenquimal para formação dos três folhetos embrionários (Moustakas e Heldin, 2016). Estudos recentes verificaram o papel desta família na manutenção da pluripotência e diferenciação no desenvolvimento embrionário inicial (Wu e Hill, 2009; Graham *et al.*, 2014; Ghimire *et al.*, 2015). Sobre as moléculas da TGF-beta durante o desenvolvimento até blastocisto, já foi observada a presença dessas proteínas desde zigoto até blastocisto, sendo esta presença relacionada com a compactação da mórula e formação do blastocisto (Paria *et al.*, 1992). Reyes De Mochel *et al.* (2015) verificou a necessidade da sinalização do BMP para a realização das primeiras clivagens embrionárias. Além disso, recentemente foi demonstrado que a inibição dos TGF-beta durante o CIV altera a taxa de blastocisto, número de células e os genes relacionados com pluripotência (Hajian *et al.*, 2016). Sendo assim, a via de sinalização TGF-beta parece ter grande importância durante todo o processo de maturação e desenvolvimento embrionário inicial. De fato, nos embriões *in vivo* esta via foi modulada por miRNAs, enquanto nos produzidos *in vitro* não.

Concluindo, este estudo permitiu verificar como a PIVE altera o perfil de miRNAs e as vias reguladas por estes ao longo da maturação e desenvolvimento embrionário. Verificamos que os miRNAs regulam vias importantes para manutenção da célula, como vias de metabolismo, e vias relacionadas com a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. Os achados aqui apresentados representam importantes avanços na pesquisa de novas vias alvo a serem manipuladas durante a

PIVE para que os blastocistos obtidos possuem maior semelhança com os obtidos no processo *in vivo*.

9.- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

9.1.- Conclusões e considerações finais gerais

A comparação da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial entre a produção *in vitro* e *in vivo* permitiu obter achados inéditos que acreditamos terem implicações importantes no fornecimento de conhecimento da biologia do desenvolvimento e a PIVE. Antes do melhoramento de qualquer biotécnica é preciso saber e diferenciar o que é fisiológico e o que é uma alteração decorrente da biotécnica. Dentro das limitações deste trabalho, acreditamos que os resultados apresentados auxiliem a elucidar parte das alterações no metabolismo celular, homeostase e perfil de miRNA que o sistema *in vitro* provoca ao longo do processo.

Mediante a comparação do comportamento das células do cumulus e oócitos, separadamente, antes e após a maturação *in vivo* e *in vitro* verificou-se o quão distante a maturação *in vitro* encontra-se do processo *in vivo*. Este trabalho nos permitiu verificar alterações no conteúdo lipídico e estresse celular oocitário subsequentes ao sistema *in vitro*. Constatamos também uma desregulação massiva das vias relacionadas com metabolismo e homeostase celular nas células do cumulus, e como pode ser, em parte, responsável pelas alterações encontradas no oócito. A descoberta de um possível transporte de ácidos graxos mediada pela FABP3 e TZPs nos permitiu verificar que alterações metabólicas que acontecem nas células do cumulus podem repercutir negativamente no oócito e consequente no desenvolvimento embrionário, sendo que estas alterações foram parcialmente perpetuadas até a formação do blastocisto durante a PIVE. Além do mais, mostramos como o sistema *in vitro* pode modificar a modulação de vias importantes para a maturação e desenvolvimento embrionário mediante miRNAs. Este tipo de trabalho revela a importância de conhecer o que é fisiológico e o que não é para poder futuramente aperfeiçoar a PIVE.

9.2.- Conclusões e considerações finais específicas de cada estudo

9.2.1.- Estudo 1: “A maturação *in vitro* gera complexos cumulus-oócitos metabolicamente desregulados e estressados em bovino”.

Neste estudo foi possível concluir que a primeira etapa da PIVE, a MIV, repercute negativamente no metabolismo lipídico e homeostase oocitário. Verificamos que as alterações observadas no oócito maturado *in vitro* não são acompanhadas de alterações dos mRNAs ou miRNAs, no entanto, ocorre uma massiva desregulação nas células do cumulus. Sabendo das comunicações entre células do cumulus e oócito, maiores estudos precisam serem feitos para entender como as alterações nas células do cumulus pode interferir no fenótipo encontrado no oócito. Os resultados obtidos neste estudo, junto aos encontrados no estudo 2, nos fazem pensar que essas alterações nas células do cumulus possam ser um dos maiores responsáveis das alterações encontradas no oócito submetido à maturação *in vitro*.

9.2.2- Estudo 2.- “A proteína ligadora de ácidos graxos 3 (*Fatty Acid Binding Protein 3* - FABP3) e as projeções transzonais estão envolvidas no acúmulo lipídico durante a maturação *in vitro* em oócitos bovinos”.

Conclui-se que o aumento lipídico observado nas células do cumulus durante a MIV pode levar a um aumento da expressão da FABP3 com intuito de enviar ácidos graxos para o ambiente extracelular. Neste caso, é possível concluir que a FABP3 proveniente das células do cumulus e as TZPs podem estar envolvidas no acúmulo lipídico oocitário descrito na MIV. Esta é a primeira vez que se descreve um possível mecanismo de transporte lipídico dentro do COC. São necessários maiores estudos que ajudem a compreender como esse transporte ocorre, se é mediado por vesículas extracelulares e se ele ocorre em apenas uma única direção. Os achados obtidos neste estudo constituem o primeiro passo em direção à criação de ferramentas capazes de inibir ou atenuar o transporte de FABP3 desde as células do cumulus até o oócito, gerando assim oócitos com menor acúmulo lipídico em ambientes metabolicamente alterados, como o sistema *in vitro* ou em casos de obesidade, com potencial de grandes implicações nas tecnologias da reprodução assistida animal e humana.

9.2.3.- Estudo 3.- “Alterações no metabolismo lipídico e homeostase celular entre embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*”.

Baseado nos resultados deste estudo, é possível concluir que, mesmo utilizando um sistema *in vitro* mais próximo ao fisiológico, como em baixa tensão de oxigênio e sem soro, o aumento do acúmulo lipídico e estresse celular embrionário ainda ocorrem. Como não houve alterações nas vias do metabolismo lipídico nos blastocistos produzidos *in vitro*, a possibilidade de que o acúmulo lipídico embrionário descrito nos embriões PIVE seja originário da MIV ou das fases iniciais do desenvolvimento fica evidente.

9.2.4.- Estudo 4- “O sistema *in vitro* altera o perfil de miRNAs durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovino”.

Este é o primeiro estudo relatando as diferenças na expressão de miRNAs e das vias reguladas por estes entre a maturação e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* e *in vivo*. Como foi observado no Estudo 1, neste estudo verificamos que a maioria das alterações decorrentes da MIV ocorreram nas células do cumulus e não no oócito. Tanto durante a maturação, quanto no desenvolvimento, com algumas pequenas exceções, mostramos que a maioria das diferenças entre o sistema *in vivo* e *in vitro* não se encontram em quais vias são reguladas e sim na intensidade da modulação destas vias. Ainda, os miRNAs exclusivos e diferentemente expressos entre grupos mostraram modular vias de comunicação e metabolismo celular e vias de sinalização importantes para a maturação e desenvolvimento embrionário inicial. Sendo assim, este estudo permitirá selecionar vias alvo a serem manipuladas, inibidas ou ativadas, ou ainda apontar miRNAs candidatos para futuros experimentos de validação da modulação durante o PIVE.

10.- REFERÊNCIAS

AARDEMA, H. et al. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. **Biol Reprod**, v. 88, n. 6, p. 164, Jun 2013. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616596> >.

AARDEMA, H. et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biol Reprod**, v. 85, n. 1, p. 62-9, Jul 2011. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311036> >.

ABD EL NABY, W. S. et al. Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. **Zygote**, v. 21, n. 1, p. 31-51, Feb 2013. ISSN 1469-8730 (Electronic) 0967-1994 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22008281> >.

ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 1, p. 57-66, Jan 2002. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11774376> >.

ADONA, P. R. et al. In vitro maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, v. 24, n. 4, p. 624-33, Aug 2016. ISSN 1469-8730 (Electronic) 0967-1994 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885679> >.

AGARWAL, A. et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertil Steril**, v. 86, n. 3, p. 503-12, Sep 2006. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860798> >.

AKBAL, E. et al. Serum heart type fatty acid binding protein levels in metabolic syndrome. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 433-7, Dec 2009. ISSN 1559-0100 (Electronic) 1355-008X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806479> >.

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 10, p. 1634-50, Oct 2010. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601089> >.

ALBERTINI, D. F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 647-53, May 2001. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427152> >.

AMIN, A. et al. Bovine Embryo Survival Under Oxidative-Stress Conditions is Associated With Activity of the NRF2-Mediated Oxidative-Stress-Response Pathway. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 6, p. 497-513, Jun 2014. ISSN 1040-452X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000337625800004 >.

ANANI, S. et al. Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. **Development**, v. 141, n. 14, p. 2813-24, Jul 2014. ISSN 1477-9129 (Electronic) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948601> >.

ANDREAS, E. et al. MicroRNA 17-92 cluster regulates proliferation and differentiation of bovine granulosa cells by targeting PTEN and BMP2 genes. **Cell Tissue Res**, v. 366, n. 1, p. 219-30, Oct 2016. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27221279> >.

ASSOU, S. et al. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. **Hum Reprod**, v. 21, n. 7, p. 1705-19, Jul 2006. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16571642> >.

ASSOU, S. et al. Comparative Gene Expression Profiling in Human Cumulus Cells according to Ovarian Gonadotropin Treatments. **Biomed Research International**, 2013. ISSN 2314-6133. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000324703600001 >.

AUCLAIR, S. et al. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and**

Metabolism, v. 304, n. 6, p. E599-E613, Mar 2013. ISSN 0193-1849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316200100005 >.

BALEY, J.; LI, J. MicroRNAs and ovarian function. **J Ovarian Res**, v. 5, p. 8, Feb 09 2012. ISSN 1757-2215 (Electronic) 1757-2215 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22321819> >.

BOMFIM, M. M. **Efeitos do estresse oxidativo durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre o miR-199a e genes alvo *ERBB2* e *ERBB3***. 2017. 163 (Master). Biociência Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

BORRADAILE, N. M. et al. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. **J Lipid Res**, v. 47, n. 12, p. 2726-37, Dec 2006. ISSN 0022-2275 (Print) 0022-2275 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960261> >.

BRAVO, R. et al. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 1, p. 16-20, Jan 2012. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064245> >.

CARDOZO, E.; PAVONE, M. E.; HIRSHFELD-CYTRON, J. E. Metabolic syndrome and oocyte quality. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 3, p. 103-109, Mar 2011. ISSN 1043-2760. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288731300004 >.

CETICA, P. et al. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p. 675-81, Nov 2002. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417006> >.

CHANKITISAKUL, V. et al. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 590-8, Mar 01 2013. ISSN 1879-3231 (Electronic) 0093-691X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261307> >.

CHARLIER, C. et al. Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution. **Bmc Genomics**, v. 13, Oct 19 2012. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312957000001 >.

CHEN, M. B. et al. MicroRNA-451 regulates AMPK/mTORC1 signaling and fascin1 expression in HT-29 colorectal cancer. **Cell Signal**, v. 26, n. 1, p. 102-9, Jan 2014. ISSN 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899558> >.

COMBELLES, C. M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? **Reprod Biomed Online**, v. 18, n. 6, p. 864-80, Jun 2009. ISSN 1472-6491 (Electronic) 1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490793> >.

CORCORAN, D. et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. **Reproduction**, v. 131, n. 4, p. 651-60, Apr 2006. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595716> >.

CUI, X. S. et al. Maternal gene transcription in mouse oocytes: genes implicated in oocyte maturation and fertilization. **J Reprod Dev**, v. 53, n. 2, p. 405-18, Apr 2007. ISSN 0916-8818 (Print) 0916-8818 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179655> >.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biol Reprod**, v. 86, n. 3, p. 71, Mar 2012. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116803> >.

DE LOOS, F. et al. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Mol Reprod Dev**, v. 28, n. 3, p. 255-9, Mar 1991. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2015084> >.

DE LOOS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res**, v. 24, n. 2, p. 197-204, Oct 1989. ISSN 0148-7280 (Print) 0148-7280 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2793058> >.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, n. 1-2, p. 19-25, Apr 29 2005. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228968300004 >.

DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, May 19 2015. ISSN 1031-3613 (Electronic) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25986410> >.

DIAKOGIANNAKI, E.; WELTERS, H. J.; MORGAN, N. G. Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. **J Endocrinol**, v. 197, n. 3, p. 553-63, Jun 2008. ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492819> >.

DIAZ, P. et al. Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 12, p. R1569-R1577, Dec 15 2015. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000367293000012 >.

DONG, J. W. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, n. 6600, p. 531-535, Oct 10 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VL75500052 >.

DOWNS, S. M.; MOSEY, J. L.; KLINGER, J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 76, n. 9, p. 844-53, Sep 2009. ISSN 1098-2795 (Electronic) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19455666> >.

DRAGOVIC, R. A. et al. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2798-806, Jun 2005. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761035> >.

DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, p. 303-316, Feb 2015. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000348966700002 >.

DUMOULIN, J. C. et al. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. **Hum Reprod**, v. 14, n. 2, p. 465-9, Feb 1999. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099995> >.

DUNNING, K. R. et al. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87327, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24505284> >.

DUNNING, K. R. et al. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biol Reprod**, v. 83, n. 6, p. 909-18, Dec 2010. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686180> >.

EICHENLAUB-RITTER, U. et al. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 783-96, Sep 2011. ISSN 1872-8278 (Electronic) 1567-7249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817047> >.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, Dec 2001. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172763000001 >.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2890-2894, Mar 5 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174284600055 >.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **J Reprod Fertil**, v. 116, n. 2, p. 373-8, Jul 1999. ISSN 0022-4251 (Print) 0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10615263> >.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, Mar 15 2009. ISSN 0093-691x. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263808800015 >.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 19 1998. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486653> >.

FUJITA, K. et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. **Sci Rep**, v. 7, p. 42961, Feb 17 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28211531> >.

FURUHASHI, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 6, p. 489-503, Jun 2008. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256302200019 >.

GAD, A. et al. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. **Biol Reprod**, v. 87, n. 4, p. 100, Oct 2012. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811576> >.

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25,

n. 3, p. 279-283, Jul 2000. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087920900013 >.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: Role of amino acids, EDTA and physical parameters. **Human Reproduction**, v. 11, n. 12, p. 2703-2712, Dec 1996. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996WE39900028 >.

GEBREMEDHN, S. et al. Dynamics and role of MicroRNAs during mammalian follicular development. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 257-263, Jul-Sep 2016. ISSN 1806-9614. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000382285100013 >.

GEBREMEDHN, S. et al. MicroRNA Expression Profile in Bovine Granulosa Cells of Preovulatory Dominant and Subordinate Follicles during the Late Follicular Phase of the Estrous Cycle. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125912, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25993098> >.

GEBREMEDHN, S. et al. MicroRNA-183-96-182 Cluster Regulates Bovine Granulosa Cell Proliferation and Cell Cycle Transition by Coordinately Targeting FOXO1. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 6, Jun 1 2016. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000379572800003 >.

GHIMIRE, S. et al. Inhibition of transforming growth factor beta signaling promotes epiblast formation in mouse embryos. **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 4, p. 497-506, Feb 15 2015. ISSN 1557-8534 (Electronic) 1547-3287 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245024> >.

GIANNAKAKIS, A. et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 7, n. 2, p. 255-64, Feb 2008. ISSN 1555-8576 (Electronic) 1538-4047 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059191> >.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 2003. ISBN 85-87528-61-0.

GILCHRIST, R. B. et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 18, p. 3811-3821, Sep 15 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240386300010 >.

GOMEZ, E. et al. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 1013-1021, May 2008. ISSN 0093-691x. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255164600015 >.

GOOSSENS, K. et al. Regulatory microRNA network identification in bovine blastocyst development. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 13, p. 1907-20, Jul 01 2013. ISSN 1557-8534 (Electronic) 1547-3287 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398486> >.

GORDON, I. Maturing the bovine oocyte. In: PRESS, C. U. (Ed.). **Laboratory production of cattle embryos**, 2003. cap. 4, p.112-157.

GOTO, Y. et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. **Free Radic Biol Med**, v. 15, n. 1, p. 69-75, Jul 1993. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8359711> >.

GRAF, A. et al. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 11, p. 4139-44, Mar 18 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591639> >.

GRAHAM, S. J. et al. BMP signalling regulates the pre-implantation development of extra-embryonic cell lineages in the mouse embryo. **Nat Commun**, v. 5, p. 5667, Dec 16 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25514175> >.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum Reprod Update**, v. 7, n. 2, p. 175-89, Mar-Apr 2001. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11284661> >.

GUO, J. et al. Reduced miR-200b and miR-200c expression contributes to abnormal hepatic lipid accumulation by stimulating JUN expression and activating the transcription of srebp1. **Oncotarget**, May 5 2016. ISSN 1949-2553 (Electronic)1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27166182> >.

HAIDER, D. G. et al. Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 761a-763, Sep 2007. ISSN 1462-8902. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248965900019 >.

HAIJIAN, M. et al. Targeting the transforming growth factor-beta signaling during pre-implantation development in embryos of cattle, sheep and goats. **Growth Factors**, v. 34, n. 3-4, p. 141-8, Aug 2016. ISSN 1029-2292 (Electronic) 0897-7194 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27442780> >.

HALUZI, M. M. et al. Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment. **Physiol Res**, v. 58, n. 1, p. 93-9, 2009. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198986> >.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Anim Reprod Sci**, v. 98, n. 1-2, p. 113-28, Mar 2007. ISSN 0378-4320 (Print) 0378-4320 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158002> >.

HEERWAGEN, M. J. et al. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 3, p. R711-22, Sep 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631295> >.

HEINZMANN, J. et al. Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 78, n. 3, p. 188-201, Mar 2011. ISSN 1098-2795 (Electronic) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290475> >.

HERLANDS, R. L.; SCHULTZ, R. M. Regulation of Mouse Oocyte Growth - Probable Nutritional Role for Intercellular Communication between Follicle Cells and Oocytes in Oocyte Growth. **Journal of Experimental Zoology**, v. 229, n. 2, p. 317-325, 1984. ISSN 0022-104x. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984SD99800016 >.

HERTZEL, A. V.; BERNLOHR, D. A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 5, p. 175-80, Jul 2000. ISSN 1043-2760 (Print) 1043-2760 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856918> >.

HIRATE, Y. et al. Polarity-dependent distribution of angiotensin II localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. **Curr Biol**, v. 23, n. 13, p. 1181-94, Jul 08 2013. ISSN 1879-0445 (Electronic) 0960-9822 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791731> >.

HOSHINO, Y. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 69, n. 1, p. 77-86, Sep 2004. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15278907> >.

HOSSAIN, M. M. et al. The role of microRNAs in mammalian oocytes and embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1-2, p. 36-44, Sep 2012. ISSN 0378-4320. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309443100006 >.

HOTAMISLIGIL, G. S.; BERNLOHR, D. A. Metabolic functions of FABPs-mechanisms and therapeutic implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 10, p. 592-605, Oct 2015a. ISSN 1759-5029. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361539700006 >.

HSUEH, A. J. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocr Rev**, v. 36, n. 1, p. 1-24, Feb 2015. ISSN 1945-7189 (Electronic) 0163-769X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202833> >.

HURWITZ, S. N. et al. Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers. **Oncotarget**, v. 7, n. 52, p. 86999-87015,

Dec 27 2016. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27894104> >.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol**, v. 296, n. 2, p. 514-21, Aug 15 2006. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854407> >.

HWANG, H. W.; MENDELL, J. T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. **Br J Cancer**, v. 96 Suppl, p. R40-4, 2007. ISSN 0007-0920 (Print) 0007-0920 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393584> >.

IMBAR, T.; EISENBERG, I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function. **Fertil Steril**, v. 101, n. 6, p. 1524-30, Jun 2014. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882616> >.

ISO, T. et al. Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, n. 11, p. 2549-57, Nov 2013. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968980> >.

JEON, T. I. et al. An SREBP-responsive microRNA operon contributes to a regulatory loop for intracellular lipid homeostasis. **Cell Metab**, v. 18, n. 1, p. 51-61, Jul 2 2013. ISSN 1932-7420 (Electronic) 1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23823476> >.

JIANG, Z. et al. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics**, v. 15, p. 756, Sep 04 2014. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185836> >.

JUNGHEIM, E. S. et al. Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 6, p. 1970-1974, May 2011. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289620900025 >.

KALRA, H. et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **PLoS Biol**, v. 10, n. 12, p. e1001450, 2012. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271954> >.

KARAKAS, S. E.; ALMARIO, R. U.; KIM, K. Serum fatty acid binding protein 4, free fatty acids, and metabolic risk markers. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 58, n. 7, p. 1002-1007, Jul 2009. ISSN 0026-0495. Disponível em: < [Go to ISI://WOS:000267190500015](http://WOS:000267190500015) >.

KATZ-JAFFE, M. G. et al. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 939-46, Apr 01 2009. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150733> >.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biol Reprod**, v. 62, n. 4, p. 847-56, Apr 2000. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727252> >.

KHURANA, N. K.; WALES, R. G. Effects of oxygen concentration on the metabolism of [U-14C]glucose by mouse morulae and early blastocysts in vitro. **Reprod Fertil Dev**, v. 1, n. 2, p. 99-106, 1989. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2798946> >.

KIM, J. Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 131-8, Jul 2001. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425337> >.

KIM, Y. J. et al. MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 3050-3061, Nov 2013. ISSN 0268-1161. Disponível em: < [Go to ISI://WOS:000325762400021](http://WOS:000325762400021) >.

KRALISCH, S. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 9, p. 1251-1254, Sep 2014. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342357800017 >.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annu Rev Anim Biosci**, v. 1, p. 393-417, Jan 2013. ISSN 2165-8110 (Electronic) 2165-8102 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25387025> >.

KRUIP, T. A. M. et al. Structural-Changes in Bovine Oocytes during Final Maturation Invivo. **Gamete Research**, v. 8, n. 1, p. 29-47, 1983. ISSN 0148-7280. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983RB17600004 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1120080105/abstract> >.

KRZYTEK-KORPACKA, M. et al. Circulating adipocyte fatty acid-binding protein, juvenile obesity, and metabolic syndrome. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 24, n. 11-12, p. 921-8, 2011. ISSN 0334-018X (Print) 0334-018X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308843> >.

KUES, W. A. et al. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 50, p. 19768-73, Dec 16 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064908> >.

LEI, L. et al. The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 315, n. 1-2, p. 63-73, Feb 05 2010. ISSN 1872-8057 (Electronic) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799966> >.

LEROY, J. L. et al. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 485-95, Oct 2005. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183866> >.

LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v. 366, n. 6453, p. 362-5, Nov 25 1993. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8247133> >.

LI, H. Y. et al. MicroRNA-451 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via downregulation of Pi3k/Akt pathway. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 6, p. 3631-4, 2013. ISSN 2476-762X (Electronic) 1513-7368 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886157> >.

LI, L. et al. Hypoxia-induced miR-210 in epithelial ovarian cancer enhances cancer cell viability via promoting proliferation and inhibiting apoptosis. **Int J Oncol**, v. 44, n. 6, p. 2111-20, Jun 2014. ISSN 1791-2423 (Electronic) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24715221> >.

LI, Z. et al. MicroRNA-451 plays a role in murine embryo implantation through targeting Ankrd46, as implicated by a microarray-based analysis. **Fertil Steril**, v. 103, n. 3, p. 834-4 e4, Mar 2015. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25542822> >.

LODDE, V. et al. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **J Assist Reprod Genet**, v. 30, n. 9, p. 1219-26, Sep 2013. ISSN 1573-7330 (Electronic) 1058-0468 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881161> >.

LONERGAN, P. et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biol Reprod**, v. 69, n. 4, p. 1424-31, Oct 2003. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826577> >.

MA, Y. et al. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. **J Mol Biol**, v. 318, n. 5, p. 1351-65, May 17 2002. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12083523> >.

MACABELLI, C. H. et al. Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e93287, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676354> >.

MACAULAY, A. D. et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biol Reprod**, v. 91, n. 4, p. 90, Oct 2014. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143353> >.

MACAULAY, A. D. et al. Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. **Biol Reprod**, v. 94, n. 1, p. 16, Dec 2016. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586844> >.

MAGNUSON, T.; DEMSEY, A.; STACKPOLE, C. W. Characterization of intercellular junctions in the preimplantation mouse embryo by freeze-fracture and thin-section electron microscopy. **Dev Biol**, v. 61, n. 2, p. 252-61, Dec 1977. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/590626> >.

MALDONADO, E. N.; LEMASTERS, J. J. ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect. **Mitochondrion**, v. 19, p. 78-84, Nov 2014. ISSN 1567-7249. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000346624700010 >.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 12, p. 2277-93, Dec 2007. ISSN 1523-0864 (Print) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979528> >.

MANIPALVIRATN, S.; DECHERNEY, A.; SEGARS, J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. **Fertil Steril**, v. 91, n. 2, p. 305-15, Feb 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201275> >.

MAREI, W. F.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. The Effect of Linolenic Acid on Bovine Oocyte Maturation and Development. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1064-1072, Dec 2009. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272030300005 >.

MARQUEZRUIZ, G.; MARTINPOLVILLO, M.; DOBARGANES, M. C. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. **Journal of Chromatography A**, v. 749, n. 1-2, p. 55-60, Oct 18 1996. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VR64700010 >.

MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reprod Fertil Dev**, v. 24, n. 1, p. 59-67, 2011. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394718> >.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Mechanisms of TGFbeta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. **J Clin Med**, v. 5, n. 7, Jun 29 2016. ISSN 2077-0383 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27367735> >.

MUCCI, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-62, May 2006. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229883> >.

NAGARAJA, A. K. et al. Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. **Mol Endocrinol**, v. 22, n. 10, p. 2336-52, Oct 2008. ISSN 0888-8809 (Print) 0888-8809 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687735> >.

NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 4, p. 599-609, Apr 2004. ISSN 0002-9297 (Print) 0002-9297 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991528> >.

PACZKOWSKI, M. et al. Comparative importance of fatty acid beta-oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus oocyte complexes. **Biol Reprod**, v. 88, n. 5, p. 111, May 2013. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536372> >.

PAN, B. et al. MicroRNA-378 regulates oocyte maturation via the suppression of aromatase in porcine cumulus cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 6, p. E525-34, Mar 15 2015. ISSN 1522-1555 (Electronic) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628423> >.

PARIA, B. C. et al. Localization and binding of transforming growth factor-beta isoforms in mouse preimplantation embryos and in delayed and activated blastocysts. **Dev Biol**, v. 151, n. 1, p. 91-104, May 1992. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577201> >.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 5, p. 665-U4, Nov 1935. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000202270000003 >.

POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Chilling Sensitivity of Mammalian Embryos. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 101-106, Jan 1994. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994MM73900013 >.

PRASTOWO, S. et al. Fateful triad of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is associated with expression outline of the AMP-activated protein kinase pathway in bovine blastocysts. **Reprod Fertil Dev**, Feb 24 2016. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907741> >.

REYES DE MOCHEL, N. S. et al. BMP signaling is required for cell cleavage in preimplantation-mouse embryos. **Dev Biol**, v. 397, n. 1, p. 45-55, Jan 01 2015. ISSN 1095-564X (Electronic) 0012-1606 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446538> >.

RIZOS, D. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2002. ISSN 0006-3363 1529-7268.

RIZOS, D. et al. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 62, n. 3, p. 320-7, Jul 2002. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112595> >.

RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-243, Jan 2003. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180111500032 >.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 2, p. 234-48, Feb 2002. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803560> >.

ROBKER, R. L. et al. Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1533-1540, May 2009. ISSN 0021-972x. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265851500010 >.

ROBKER, R. L.; WU, L. L. Y.; YANG, X. Inflammatory pathways linking obesity and ovarian dysfunction. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 88, n. 2, p. 142-148, Mar 2011. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289597600010 >.

ROSENBLUTH, E. M. et al. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation. **Fertil Steril**, v. 101, n. 5, p. 1493-500, May 2014. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24786747> >.

RUSSELL, D. L. et al. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 62-68, Jul 1 2016. ISSN 0093-691x. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000377643700007 >.

SANCHEZ-LAZO, L. et al. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 9, p. 1502-21, Sep 2014. ISSN 1944-9917 (Electronic) 0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058602> >.

SANG, Q. et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 7, p. 3068-79, Jul 2013. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666971> >.

SATA, R. et al. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, n. 1, p. 97-103, 1999.

SEIDEL, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 228-235, Jan 7 2006. ISSN 0093-691x. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234013900021 >.

SIMON, A. M.; GOODENOUGH, D. A. Diverse functions of vertebrate gap junctions. **Trends Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 477-83, Dec 1998. ISSN 0962-8924 (Print) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861669> >.

SOHEL, M. M. et al. Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78505, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24223816> >.

SOMFAI, T. et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 7, p. 912-20, 2011. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871210> >.

SONG, C. L. et al. PPAR gamma is regulated by miR-27b-3p negatively and plays an important role in porcine oocyte maturation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 2, p. 224-230, Oct 14 2016. ISSN 0006-291x. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000385898900017 >.

SUBRA, C. et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 8, p. 2105-2120, Aug 2010. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279896800008 >.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum Reprod Update**, v. 9, n. 1, p. 35-48, Jan-Feb 2003. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12638780> >.

SUZUKI, Y.; MIYOSHI, N.; ISEMURA, M. Health-promoting effects of green tea. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 88, n. 3, p. 88-101, 2012. ISSN 1349-2896 (Electronic) 0386-2208 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450537> >.

TAKAHASHI, T. et al. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Reprod Fertil Dev**, v. 25, n. 4, p. 589-99, 2013. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954232> >.

TANG, F. et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes Dev**, v. 21, n. 6, p. 644-8, Mar 15 2007. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369397> >.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. **Frontiers in Genetics**, v. 4, 2013. ISSN 1664-8021.

TESFAYE, D. et al. Potential role of microRNAs in mammalian female fertility. **Reprod Fertil Dev**, v. 29, n. 1, p. 8-23, Jan 2016. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28278789> >.

TESFAYE, D. et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. **Mol Reprod Dev**, v. 76, n. 7, p. 665-77, Jul 2009. ISSN 1098-2795 (Electronic) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19170227> >.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. **Biol Reprod**, v. 70, n. 3, p. 548-56, Mar 2004. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568915> >.

THOMPSON, J. G. et al. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. **J Reprod Fertil**, v. 118, n. 1, p. 47-55, Jan 2000. ISSN 0022-4251 (Print) 0022-4251 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793625> >.

VAN SOOM, A. et al. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1453-65, Mar 15 2002. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054204> >.

VEERKAMP, J. H.; VANMOERKERK, H. T. B. Fatty-Acid-Binding Protein and Its Relation to Fatty-Acid Oxidation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 123, n. 1-2, p. 101-106, Jun 9 1993. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LT15500013 >.

WILLIAMS, A. H. et al. MicroRNA control of muscle development and disease. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 3, p. 461-9, Jun 2009. ISSN 1879-0410 (Electronic) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19278845> >.

WU, L. L. et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5438-45, Nov 2010. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861227> >.

WU, M. Y.; HILL, C. S. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. **Dev Cell**, v. 16, n. 3, p. 329-43, Mar 2009. ISSN 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289080> >.

YANG, H. W. et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 998-1002, Apr 1998. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074269700041 >.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Apoptosis in bovine oocytes and in preimplantation embryos: The role of Bcl-2 and Bax genes. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 222-222, 1999. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081141300478 >.

YANG, X. et al. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, n. 8, p. 1262-71, 2010. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883652> >.

YANG, X. et al. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1438-1443, Jun 2012. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304770900039 >.

YONEDA, T. et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. **J Biol Chem**, v. 276, n. 17, p. 13935-40, Apr 27 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278723> >.

YOON, S. B. et al. Developmental Competence of Bovine Early Embryos Depends on the Coupled Response Between Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress. **Biology of**

Reproduction, v. 90, n. 5, May 2014. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336792100001 >.

YOUNG, L. E. et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153-154, Feb 2001. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166839200013 >.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155-163, Sep 1998. ISSN 1359-6004. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000079348800004 >.

ZANOTTI, G. Muscle fatty acid-binding protein. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2-3, p. 94-105, Nov 23 1999. ISSN 1388-1981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084070000002 >.

ZENG, H. T. et al. Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes. **Biol Reprod**, v. 91, n. 2, p. 47, Aug 2014. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966394> >.

ZHANG, Y. et al. Fatty acid binding protein 3 (fabp3) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications in a northern european family population. **Bmc Medical Genomics**, v. 6, Mar 19 2013. ISSN 1755-8794. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316694200001 >.

11.- APÊNDICE

APÊNDICE A. Cromatograma HPLC dos lipídeos ionizados $[M+NH_3]^+$ nas células do *cumulus* e oócitos imaturos e maturados *in vivo* e *in vitro* mensurados por espectrometria de massas, onde os círculos indicam os padrões internos dos diacilglicerois e os asteriscos padrões internos dos triacilglicerois.

APÊNDICE B. Tabela indicando parâmetros do ESI-MS/MS com $[M+NH_3]^+$. Linhas em negrito indicam os padrões internos. Q1 = quadrupolo 1; Q3 = quadrupolo 3; Dwell = tempo dwell em milissegundos; DP = potencial de desclusterização; CE = energia de colisão; CXP = potencial de saída de células colisionadas; RT = tempo de retenção em minutos; ID = identificação; MG = monoacilglicerol; DG = diacilglicerol; TG = triacilglicerol; IS = padrão interno.

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	DP	CE	CXP	RT (min)	ID
292.3	275.3	100	80	15	5	9.2	MG12:0
318.6	301.4	100	80	15	5	10.0	MG14:1
320.3	303.5	100	80	15	5	8.9	MG14:0
346.4	328.5	100	80	15	5	9.7	MG16:1
348.6	331.3	100	80	15	5	9.9	MG16:0
370.6	353.5	100	80	15	5	8.9	MG18:3
372.5	355.3	100	80	15	5	8.2	MG18:2
374.5	357.6	100	80	15	5	8.0	MG18:1
376.4	359.7	100	80	15	5	10.2	MG18:0
396.5	379.6	100	80	15	5	9.4	MG20:4
404.6	387.5	100	80	15	5	6.0	MG20:0
428.5	411.4	100	80	15	5	2.7	MG22:2
460.0	441.6	100	80	15	5	4.1	MG24:0
486.6	569.5	100	80	15	5	5.3	MG26:1
535.6	500.3	100	80	25	5	12.2	IS14:0(2)
558.6	523.6	100	80	25	5	12.6	DG15:0(2)
586.4	551.7	100	80	25	5	13.2	DG16:0(2)
591.4	556.7	100	80	25	5	15.5	IS16:0(2)
614.6	579.7	100	80	20	5	14.1	DG17:0(2)
619.6	584.7	100	80	25	5	14.1	IS17:0(2)
630.6	595.6	100	80	20	5	10.2	DG18:3
634.6	599.6	100	80	20	5	12.3	DG18:2
638.7	603.5	100	80	20	5	13.3	DG18:1
642.5	607.3	100	80	20	5	14.6	DG18:0
656.6	439.4	100	80	30	5	14.6	TG(12:0)3
670.7	635.7	100	80	20	5	15.9	DG19:0(2)
675.7	640.7	100	80	25	5	15.9	IS19:0(2)
678.6	643.7	100	80	22	5	11.3	DG20:5(2)
682.8	647.7	100	80	20	5	10.6	DG20:4(2)
683.6	364.2	100	80	25	5	11.3	IS20:5(2)
687.8	366.4	100	80	25	5	10.6	IS20:4(2)
690.4	655.7	100	80	22	5	10.5	DG20:2(2)
695.4	660.7	100	80	25	5	10.5	IS20:2(2)
698.3	663.7	100	80	22	5	0.5	DG20:0(2)
703.3	668.7	100	80	25	5	10.0	IS20:0(2)
734.6	491.4	100	80	30	5	14.9	TG(14:1)3
738.4	703.6	100	80	20	5	11.2	DG22:4
740.7	495.4	100	80	30	5	14.6	TG(14:0)3
771.6	526.6	200	80	30	5	18.3	IS14:0(2)-16:0
797.6	759.6	100	80	20	5	12.6	DG24:4
806.6	771.5	100	80	20	5	12.7	DG24:1
810.8	775.9	100	80	20	5	14.0	DG24:0
818.7	547.4	100	80	30	5	18.6	TG(16:1)3
822.5	563.6	100	80	35	5	22.2	TG15:0(2)_18:1
824.8	551.5	100	80	30	5	23.7	TG(16:0)3
827.5	568.6	200	80	30	5	22.2	IS15:0(2)-18:1
852.3	579.3	100	80	35	5	23.8	TG(16:0)18:0
857.8	542.6	200	80	30	5	28.2	IS19:0(2)-12:0
864.8	577.7	100	80	35	5	26.2	TG17:0(2)_17:1
869.8	582.7	200	80	30	5	26.2	IS17:0(2)-17:1
890.7	595.5	100	80	30	5	18.0	TG(18:3)3
896.8	599.6	100	80	30	5	17.9	TG(18:2)3
902.3	551.5	100	80	35	5	22.1	TG(16:2)18:1
902.8	603.6	100	80	30	5	24.1	TG(18:1)3
908.9	607.6	100	80	30	5	17.5	TG(18:0)3
944.7	647.3	100	80	38	5	17.2	TG20:4(2)_18:2
949.7	628.7	200	80	30	5	17.2	IS20:4(2)-18:2
950.9	625.6	100	80	35	5	19.9	TG20:2(2)_18:2
955.9	630.6	200	80	30	5	19.9	IS20:2(2)18:2
988.8	695.6	100	80	30	5	14.4	TG20:5(2)_22:6
991.0	663.6	100	80	35	5	14.2	TG20:0(2)_20:1
993.8	674.6	200	80	30	5	14.4	IS20:5(2)-22:6
996.0	676.7	200	80	30	5	14.2	IS20:0(2)-20:1

APÊNDICE C- Lista dos genes e dos respectivos miRNA validados (miRtarBase) ou preditos (TargetScan).

Gene alvo	miRNAs	Estatus
<i>SREBP1</i>	hsa-miR-33a-5p/ bta-miR-33a	miRNA validado em humano e conservado em bovino
<i>FASN</i>	bta-miR-15b	Bovine validated miRNAs
	bta-miR-16a	Bovine validated miRNAs
<i>ACACA</i>	-	-
<i>PLIN2</i>	-	-
<i>PLIN3</i>	-	-
<i>FADS2</i>	-	-
<i>SCD</i>	bta-miR-181a	miRNAs validados em bovino
<i>ACSL3</i>	Bta-miR-26a	miRNAs preditos
	Bta-miR-26b	miRNAs preditos
	bta-miR-223	miRNAs preditos
	bta-miR-200b	miRNAs preditos
	bta-miR-200c	miRNAs preditos
	bta-miR-429	miRNAs preditos
	bta-miR-202	miRNAs preditos
	bta-miR-132	miRNAs preditos
	bta-miR-23b-3p	miRNAs preditos
	bta-miR-23a	miRNAs preditos
	bta-miR-381	miRNAs preditos
	bta-miR-421	miRNAs preditos
<i>ACSL6</i>	bta-miR-137	miRNAs preditos
	bta-miR-15a	miRNAs preditos
	bta-miR-15b	miRNAs preditos
	bta-miR-16a	miRNAs preditos
	bta-miR-16b	miRNAs preditos
	bta-miR-195	miRNAs preditos
	bta-miR-424-5p	miRNAs preditos
	bta-miR-497	miRNAs preditos
	bta-miR-218	miRNAs preditos
	bta-miR-24-3p	miRNAs preditos
	bta-miR-142-5p	miRNAs preditos
	bta-miR-503-5p	miRNAs preditos
	bta-miR-181a	miRNAs preditos
	bta-miR-181b	miRNAs preditos
	bta-miR-181c	miRNAs preditos
	bta-miR-181d	miRNAs preditos
	bta-miR-374a	miRNAs preditos
	bta-miR-374b	miRNAs preditos

	bta-miR-186	miRNAs preditos
	bta-miR-582	miRNAs preditos
	bta-miR-448	miRNAs preditos
	bta-miR-330	miRNAs preditos
	bta-miR-495	miRNAs preditos
<i>ELOVL6</i>	hsa-miR-211-5p / bta-miR-211	miRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-204-5p / bta-miR-204	miRNA validado em humano e conservado em bovino
<i>CPT1A</i>	bta-miR-124a	miRNAs preditos
	bta-miR-124b	miRNAs preditos
	bta-miR-33a	miRNAs preditos
	bta-miR-33b	miRNAs preditos
	bta-miR-499	miRNAs preditos
	bta-miR-181a	miRNAs preditos
	bta-miR-181b	miRNAs preditos
	bta-miR-181c	miRNAs preditos
	bta-miR-181d	miRNAs preditos
	bta-miR-200b	miRNAs preditos
	bta-miR-200c	miRNAs preditos
	bta-miR-429	miRNAs preditos
<i>CPT1B</i>	-	-
<i>CPT2</i>	-	-
<i>G6PD</i>	hsa-miR-206 / bta-miR-206	miRNA validado em humano e conservado em bovino
<i>PGK1</i>	bta-miR-365-3p	miRNAs preditos
	bta-miR-146a	miRNAs preditos
	bta-miR-146b	miRNAs preditos
	bta-miR-143	miRNAs preditos
	bta-miR-873	miRNAs preditos
	bta-miR-495	miRNAs preditos
<i>PFKP</i>	bta-miR-17-5p	miRNAs preditos
	bta-miR-20a	miRNAs preditos
	bta-miR-20b	miRNAs preditos
	bta- miR-93	miRNAs preditos
	bta- miR-106a	miRNAs preditos
	bta- miR-106b	miRNAs preditos
	bta-miR-302b	miRNAs preditos
	bta-miR-302c	miRNAs preditos
	bta-miR-302d	miRNAs preditos
<i>IRE1</i>	hsa-miR-199a-5p / bta-miR-199a-5p	miRNA validado em humano e conservado em bovino
<i>ATF6</i>	bta-miR-204	miRNAs preditos
	bta-miR-211	miRNAs preditos
	bta-miR-223	miRNAs preditos
	bta-miR-125a	miRNAs preditos

	bta-miR-125b	miRNAs preditos
	bta-miR-670	miRNAs preditos
	bta-miR-199a-3p	miRNAs preditos
	bta-miR-25	miRNAs preditos
	bta-miR-32	miRNAs preditos
	bta-miR-92a	miRNAs preditos
	bta-miR-92b	miRNAs preditos
	bta-miR-875	miRNAs preditos
	bta-miR-149-5p	miRNAs preditos
	bta-miR-378	miRNAs preditos
<i>PERK</i>	-	-
<i>ATF4</i>	-	-
<i>CHOP10</i>	bta-miR-96	miRNAs preditos
	bta-miR-29d-3p	miRNAs preditos
<i>BAX</i>	bta-miR-29c	miRNAs preditos
	bta-miR-29b	miRNAs preditos
<i>BCL2</i>	hsa-miR-15a-5p / bta-miR-15a	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-16-5p / bta-miR-16a	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-16-5p / bta-miR-16b	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-204-5p / bta-miR-204	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-15b-5p / bta-miR-15b	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-34a-5p / bta-miR-34a	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-195-5p / bta-miR-195	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-34b-5p / bta-miR-34b	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-181a-5p / bta-miR-181a	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-181b-5p / bta-miR-181b	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-181c-5p / bta-miR-181c	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-181d-5p / bta-miR-181d	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-34c-5p / bta-miR-34c	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-449a / bta-miR-449a	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-143-3p / bta-miR-143	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-497-5p / bta-miR-497	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-182-5p / bta-miR-182	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-365a-3p / bta-miR-365-3p	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-125b-5p / bta-miR-125b	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-211-5p / bta-miR-211	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
<i>GRP78</i>	hsa-miR-199a-5p / bta-miR-199a- 5p	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-30a-5p / bta-miR-30a-5p	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	mmu-miR-181b-5p / bta-miR-181b	Mouse validated miRNA and conserved with bovine
<i>CASP3</i>	hsa-miR-30c-5p / bta-miR-30c	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-30d-5p / bta-miR-30d	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-let-7a-5p / bta-let-7a-5p	MiRNA validado em humano e conservado em bovino

<i>CASP9</i>	bta-miR-142-5p	miRNAs preditos
	bta-miR-17-5p	miRNAs preditos
	bta-miR-20a	miRNAs preditos
	bta-miR-20b	miRNAs preditos
	bta-miR-93	miRNAs preditos
	bta-miR-106a	miRNAs preditos
	bta-miR-106b	miRNAs preditos
	bta-miR-186	miRNAs preditos
	bta-miR-346	miRNAs preditos
<i>NRF2</i>	hsa-miR-27a-3p / bta-miR-27a-3p	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-144-3p / bta-miR-144	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-153-3p / bta-miR-153	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
	hsa-miR-142-5p / bta-miR-142-5p	MiRNA validado em humano e conservado em bovino
<i>KEAP1</i>	-	-
<i>SOD1</i>	-	-
<i>SOD2</i>	bta-miR-330	miRNAs preditos
	bta-miR-136	miRNAs preditos
<i>GPX1</i>	bta-miR-873	miRNAs preditos
<i>PRDX1</i>	-	-
<i>CAT</i>	hsa-miR-30b-5p / bta-miR-30b-5p	MiRNA validado em humano e conservado em bovino

APÊNDICE D. Similaridade entre as sequências de miRNAs maduros humanos e bovinos usados no RT-qPCR.

miRNA bovino	sequências maduras bovinas	miRNA humano	sequências maduras humanas	similaridade (%)
bta-let-7a-5p	ugagguaguagguuguauaguu	hsa-let-7a-5p	ugagguaguagguuguauaguu	100.00
bta-miR-125b	ucccugagaccuaacuuguga	hsa-miR-125b-5p	ucccugagaccuaacuuguga	100.00
bta-miR-142-5p	cauaaaguagaaagcacuac	hsa-miR-142-5p	cauaaaguagaaagcacuacu	95.23
bta-miR-143	ugagaugaagcacuguagcucg	hsa-miR-143-3p	ugagaugaagcacuguagcuc	95.65
bta-miR-144	uacaguauagauguacuag	hsa-miR-144-3p	uacaguauagauguacu	90.90
bta-miR-153	uugcauagucacaaaagugauc	hsa-miR-153-3p	uugcauagucacaaaagugauc	100.00
bta-miR-15a	uagcagcacauaaugguuugu	hsa-miR-15a-5p	uagcagcacauaaugguuugug	95.45
bta-miR-15b	uagcagcacauaugguuuaca	hsa-miR-15b-5p	uagcagcacauaugguuuaca	100.00
bta-miR-16a	uagcagcacguaaaauuggug	hsa-miR-16-5p	uagcagcacguaaaauuggcg	95.45
bta-miR-16b	uagcagcacguaaaauuggc	hsa-miR-16-5p	uagcagcacguaaaauuggcg	95.45
bta-miR-181a	aacauucaacgcugucggugaguu	hsa-miR-181a-5p	aacauucaacgcugucggugagu	95.83
bta-miR-181b	aacauucauugcugucggugguu	hsa-miR-181b-5p	aacauucauugcugucgguggu	95.83
bta-miR-181c	aacauucaaccugucggugaguuu	hsa-miR-181c-5p	aacauucaaccugucggugagu	91.66
bta-miR-181d	aacauucauuguugucggugggu	hsa-miR-181d-5p	aacauucauuguugucgguggu	100.00
bta-miR-182	uuuggcaaugguagaacucacacu	hsa-miR-182-5p	uuuggcaaugguagaacucacacu	100.00
bta-miR-195	uagcagcacagaaaauuggca	hsa-miR-195-5p	uagcagcacagaaaauuggc	95.45
bta-miR-199a-5p	cccaguguucagacuaccuguu	hsa-miR-199a-5p	cccaguguucagacuaccuguuc	95.65
bta-miR-204	uucccuuugucauccuagccu	hsa-miR-204-5p	uucccuuugucauccuagccu	100.00
bta-miR-206	uggaaugaaggaagugugugg	hsa-miR-206	uggaaugaaggaagugugugg	100.00
bta-miR-211	uucccuuugucauccuugcc	hsa-miR-211-5p	uucccuuugucauccuugccu	90.90
bta-miR-27a-3p	uucacaguggcuaaguuccg	hsa-miR-27a-3p	uucacaguggcuaaguuccgc	95.23
bta-miR-30a-5p	uguaaacauccucgacuggaagcu	hsa-miR-30a-5p	uguaaacauccucgacuggaag	91.66
bta-miR-30b-5p	uguaaacauccuacacucagcu	hsa-miR-30b-5p	uguaaacauccuacacucagcu	100.00
bta-miR-30c	uguaaacauccuacacucucagc	hsa-miR-30c-5p	uguaaacauccuacacucucagc	100.00
bta-miR-30d	uguaaacaucggcaguggaagcu	hsa-miR-30d-5p	uguaaacaucggcaguggaag	91.66
bta-miR-33a	gugcauuguaguugcauugca	hsa-miR-33a-5p	gugcauuguaguugcauugca	100.00
bta-miR-34a	uggcagugucuagcugguugu	hsa-miR-34a-5p	uggcagugucuagcugguugu	100.00
bta-miR-34b	aggcaguguaauagcugauug	hsa-miR-34b-5p	aggcagugucuuagcugauug	91.30
bta-miR-34c	aggcaguguaguagcugauug	hsa-miR-34c-5p	aggcaguguaguagcugauugc	96.65
bta-miR-365-3p	uaaugccccuaaaaauccuuau	hsa-miR-365a-3p	uaaugccccuaaaaauccuuau	100.00
bta-miR-449a	uggcaguguauuguagcuggu	hsa-miR-449a	uggcaguguauuguagcuggu	100.00
bta-miR-497	cagcagcacacugugguuugua	hsa-miR-497-5p	cagcagcacacugugguuugu	95.45

APÊNDICE E- Primer forward (senso) dos miRNAs utilizados nos COCs do Estudo 1.

miRNAs	Sequence (5' - 3')	miRNAs	Sequence (5' - 3')
bta-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	bta-mir-146b	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTGT
bta-miR-15a	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	bta-mir-149-5p	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC
bta-mir-15b	TAGCAGCACATCATGTTTACA	bta-mir-153	TTGCATAGTCACAAAAGTGATC
bta-mir-16a	TAGCAGCACGTAAATATTGGTG	bta-mir-181a	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTT
bta-miR-16b	TAGCAGCACGTAAATATTGGC	bta-mir-181b	AACATTCAATTGCTGTCGGTGGGT
bta-miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT	bta-mir-181c	AACATTCAACCTGTCGGTGAGTTT
bta-miR-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	bta-mir-181d	AACATTCAATTGTTGTGCGTGGGT
bta-miR-20b	CAAAGTGCTCACAGTGCAGGTA	bta-mir-182	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT
bta-miR-23a	ATCACATTGCCAGGATTTC	bta-mir-186	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT
bta-miR-23b-3p	ATCACATTGCCAGGATTACCAC	bta-mir-195	TAGCAGCACAGAAATATTGGCA
bta-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG	bta-mir-199a-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA
bta-mir-25	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA	bta-mir-199a-5p	CCCAGTGTTCACTACCTGTT
bta-miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	bta-mir-200b	TAATACTGCCTGGTAATGATG
bta-miR-26b	TTCAAGTAATCCAGGATAGGTT	bta-mir-200c	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA
bta-miR-27a-3p	TTCACAGTGGCTAAGTTCCG	bta-mir-202	TTCTATGCATATACTTCTTT
bta-mir-29b	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT	bta-mir-204	TTCCCTTTGTATCCTATGCCT
bta-mir-29c	TAGCACCATTGAAATCGGTTA	bta-mir-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG
bta-mir-29d-3p	TAGCACCATTGAAATCGATTA	bta-mir-211	TTCCCTTTGTATCCTTTGCC
bta-mir-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT	bta-mir-215	ATGACCTATGAATTGACAGACA
bta-mir-30b-5p	TGTAAACATCCTACACTCAGCT	bta-mir-218	TTGTGCTTGATCTAACCATGTG
bta-mir-30c	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC	bta-mir-223	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA
bta-mir-30d	TGTAAACATCCCGACTGGAAGCT	bta-mir-302b	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGTAG
bta-mir-32	TATTGCACATGACTAAGTTGCAT	bta-mir-302c	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG
bta-mir-33a	GTGCATTGTAGTTGCATTGCA	bta-mir-302d	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGT
bta-mir-33b	GTGCATTGCTGTTGCATTGC	bta-mir-330	GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGA
bta-mir-34a	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	bta-mir-346	TGTCTGCCCCGCATGCCTGCCTCT
bta-mir-34b	AGGCAGTGTAATTAGCTGATTG	bta-mir-365-3p	TAATGCCCCATAAAATCCTTAT
bta-mir-34c	AGGCAGTGTAATTAGCTGATTG	bta-mir-374a	TTATAATACAACCTGATAAGTG
bta-mir-92a	TATTGCACTTGTCCTGGCCTGT	bta-mir-374b	ATATAATACAACCTGCTAAGTG
bta-mir-92b	TATTGCACTGTCCTGGCCTCC	bta-mir-378	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-mir-93	CAAAGTGCTGTTCTGTGCAGGTA	bta-mir-381	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
bta-mir-96	TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT	bta-mir-421	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC
bta-mir-106a	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTA	bta-mir-424-5p	ATGACACGATCACTCCCCTTGA
bta-mir-106b	TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT	bta-mir-429	TAATACTGTCTGGTAATGCCGT
bta-mir-124a	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG	bta-mir-448	TTGCATATGTAGGATGTCCCAT
bta-mir-124b	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG	bta-mir-449a	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT
bta-mir-125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG	bta-mir-495	AAACAAACATGGTGCACCTTCTT
bta-mir-125b	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	bta-mir-497	CAGCAGCACACTGTGGTTTGTGA
bta-mir-132	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG	bta-mir-499	TTAAGACTTGCACTGATGTTT
bta-mir-136	ACTCCATTTGTTTTGATGATGGA	bta-mir-503-5p	TAGCAGCGGGAACAGTACTG
bta-mir-137	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG	bta-mir-582	TTACAGTTGTTCAACCAGTACT

bta-mir-142-5p	CATAAAGTAGAAAGCACTAC	bta-mir-670	TCCCTGAGTATATGTGGTGAA
bta-mir-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCTCG	bta-mir-873	GCAGGAACTTGTGAGTCTCCT
bta-mir-144	TACAGTATAGATGATGTACTAG	bta-mir-875	TATACCTCAGTTTATCAGGTG
bta-mir-146a	TGAGAACTGAATTCCATAGGTTGT		

APÊNDICE F- Sequências dos primers fowards (senso) dos miRNAs utilizados nos oócitos e células do cumulus do Estudo 4.

miRNAs	Sequence (5' - 3')	miRNAs	Sequence (5' - 3')
bta-let-7a-3p	CTATACAATCTACTGTCTTTC	bta-miR-345-5p	GCTGACTCCTAGTCCAGTGCT
bta-let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	bta-miR-361	TTATCAGAATCTCCAGGGGTAC
bta-let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	bta-miR-362-3p	AACACACCTATTCAAGGATTC
bta-let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT	bta-miR-362-5p	AATCCTTGGAACCTAGGTGTGAGT
bta-let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT	bta-miR-363	ATTGCACGGTATCCATCTGCG
bta-let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	bta-miR-365-5p	AGGGACTTTTGGGGGCAGATGTG
bta-let-7g	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	bta-miR-367	GAATTGCACTTTAGCAATGGTGA
bta-let-7i	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	bta-miR-369-3p	AATAATACATGGTTGATCTTT
bta-miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	bta-miR-369-5p	ATCGACCGTGTTATATTCGC
bta-miR-100	AACCCGTAGATCCGAACCTGTG	bta-miR-370	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT
bta-miR-101	TACAGTACTGTGATAACTGAA	bta-miR-371	AAGTGCCGCCATGTTTTGAGTGT
bta-miR-103	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA	bta-miR-375	TTTTGTTCGTTCCGGCTCGCGTGA
bta-miR-105a	TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT	bta-miR-376a	ATCATAGAGGAAAATCCACGT
bta-miR-105b	TCAAATGCTCAGACTCCTTGGT	bta-miR-376b	ATCATAGAGGAAAATCCATGTT
bta-miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATC	bta-miR-376c	GTGGATATTCCTTCTATGTTTA
bta-miR-10a	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	bta-miR-376d	ATCATAGAGGAAAATCCACAT
bta-miR-10b	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	bta-miR-376e	AACATAGAGGAAAATCCACATT
bta-miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG	bta-miR-377	ATCACACAAAGGCAACTTTTGT
bta-miR-126-3p	CGTACCGTGAGTAATAATGCG	bta-miR-378b	ACTTGACTTGAGTCAGAAGGC
bta-miR-126-5p	CATTATTACTTTTGGTACGCG	bta-miR-378c	ACTGGACTTGAGTCAGAAGT
bta-miR-127	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT	bta-miR-379	TGGTAGACTATGGAACGTAGG
bta-miR-128	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT	bta-miR-380-3p	TATGTAATGTGGTCCACGTCT
bta-miR-129	CTTTTTCGGTCTGGGCTTGCT	bta-miR-380-5p	TGGTTGACCATAGAACATGCGC
bta-miR-129-3p	AAGCCCTTACCCCAAAAAGCAT	bta-miR-382	GAAGTTGTTCTGTTGGATTCCG
bta-miR-129-5p	CTTTTTCGGTCTGGGCTTGCT	bta-miR-383	AGATCAGAAGGTGATTGTGGCT
bta-miR-130a	CAGTGCAATGTAAAAGGGCAT	bta-miR-409a	AGGTTACCCGAGCAACTTTGCAT
bta-miR-130b	CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT	bta-miR-409b	GGGGTTCACCGAGCAACATTC
bta-miR-133a	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG	bta-miR-410	AATATAACACAGATGGCCTGT
bta-miR-133b	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA	bta-miR-411a	ATAGTAGACCGTATAGCGTACG
bta-miR-133c	ATTTGGTTCCATTTTACCAGC	bta-miR-411b	TGGTCGACCATAAAACGTACGT
bta-miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGTGG	bta-miR-411c-3p	TGTATGTCAACTGATCCACAGT
bta-miR-135a	TATGGCTTTTTATTCTATGTGA	bta-miR-411c-5p	GGTTGATCAGAGAACATACATT
bta-miR-135b	TATGGCTTTTCAATCTATGTGA	bta-miR-412	ACTTCACCTGGTCCACTAGCTGT
bta-miR-138	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG	bta-miR-423-3p	AAGCTCGGTCTGAGGCCCTCAGT
bta-miR-139	TCTACAGTGCACGTGTCTCCAGT	bta-miR-423-5p	TGAGGGGCAGAGAGCGAGACTTT
bta-miR-140	TACCACAGGGTAGAACCACGGA	bta-miR-424-3p	CAAAACGTGAGGCGCTGCTAT
bta-miR-141	TAACACTGTCTGGTAAAGATGG	bta-miR-425-3p	ATCGGGAATGTCGTGTCGCCCC
bta-miR-142-3p	AGTGTTCCTACTTTTATGGATG	bta-miR-425-5p	ATGACACGATCACTCCCCTTGA
bta-miR-145	GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCT	bta-miR-431	TGTCTTGACAGGCCGTCATGCAGG
bta-miR-147	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA	bta-miR-432	TCTTGGAGTAGGTCATTGGGTGG

bta-miR-148a	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT	bta-miR-433	ATCATGATGGGCTCCTCGGTGT
bta-miR-148b	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT	bta-miR-449b	AGGCAGTGTATTGTTAGCTGGC
bta-miR-149-3p	GAGGGAGGGACGGGGGCTGTGC	bta-miR-449c	AGGCAGTGCATCTCTAGCTGG
bta-miR-150	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTGT	bta-miR-449d	GAAGGCTGTGTGCTGTGGAG
bta-miR-151-3p	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG	bta-miR-450a	TTTTGCGATGTGTTCTTAATAT
bta-miR-151-5p	TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT	bta-miR-450b	TTTTGCAATATGTTCTCTGAATA
bta-miR-152	TCAGTGCACTACAGAACTTGGG	bta-miR-451	AAACCGTTACCATTACTGAGTTT
bta-miR-154a	TAGGTTATCCGTGTAGCCTTCG	bta-miR-452	TGTTTGCAGAGGAACTGAGAC
bta-miR-154b	AGAGGTCTTCCATGGTGATTCTG	bta-miR-453	AGGTTGTCCGTGGTGAGTTCGCA
bta-miR-154c	AGATATTGCACGGTTGATCTCT	bta-miR-454	TAGTGCAATATTGCTTATAGGGT
bta-miR-155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	bta-miR-455-3p	GCAGTCCATGGGCATATACACT
bta-miR-17-3p	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT	bta-miR-455-5p	TATGTGCCCTTTGGACTACATC
bta-miR-183	TATGGCACTGGTAGAATTCAGT	bta-miR-483	TCACTCCTCTCCTCCCGTCTT
bta-miR-184	TGGACGGAGAACTGATAAGGGT	bta-miR-484	TCAGGCTCAGTCCCCTCCCGAT
bta-miR-185	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA	bta-miR-485	AGAGGCTGGCCGTGATGAATTCG
bta-miR-187	TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCGG	bta-miR-486	TCCTGTACTGAGCTGCCCGAG
bta-miR-188	CATCCCTTGCATGGTGGAGGGT	bta-miR-487a	AATCATACAGGGACATCCAGT
bta-miR-18a	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATA	bta-miR-487b	AATCGTACAGGGTCATCCACTT
bta-miR-18b	TAAGGTGCATCTAGTGCAGTTA	bta-miR-488	TTGAAAGGCTGTTTCTTGGTC
bta-miR-190a	TGATATGTTTGATATATTAGGT	bta-miR-489	GTGACATCACATATATGGCGAC
bta-miR-190b	TGATATGTTTGATATTGGGTT	bta-miR-490	CAACCTGGAGGACTCCATGCTG
bta-miR-191	CAACGGAATCCCAAAAGCAGCTG	bta-miR-491	AGTGGGGAACCCCTCCATGAGG
bta-miR-192	CTGACCTATGAATTGACAGCCAG	bta-miR-493	TGAAGGTCTACTGTGTGCCAGG
bta-miR-193a	GGGACTTTGTAGGCCAGTT	bta-miR-494	TGAAACATACACGGGAAACCTC
bta-miR-193a-3p	AACTGGCCTACAAAGTCCCAGT	bta-miR-496	TGAGTATTACATGGCCAATCTC
bta-miR-193a-5p	TGGGTCTTTGCGGGCGAGATGA	bta-miR-500	TAATCCTTGCTACCTGGGTGAGA
bta-miR-193b	AACTGGCCCACAAAGTCCCCTTT	bta-miR-502a	AATGCACCTGGGCAAGGATTCA
bta-miR-194	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA	bta-miR-502b	AATCCACCTGGGCAAGGATTC
bta-miR-196a	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	bta-miR-503-3p	GGAGTATTGTTTCTGCTGCCCGG
bta-miR-196b	TAGGTAGTTTCTGTTGTTGGGA	bta-miR-504	AGACCCTGGTCTGCACTCTGTC
bta-miR-197	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC	bta-miR-505	CGTCAACACTTGCTGGTTTCCT
bta-miR-199b	CCCAGTGTTTAGACTATCTGTTC	bta-miR-532	CATGCCTTGAGTGTAGGACCGT
bta-miR-199c	TACAGTAGTCTGCACATTGG	bta-miR-539	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGT
bta-miR-19a	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA	bta-miR-541	TGGTGGGCACAGAATCCGGCCT
bta-miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAACTGA	bta-miR-542-5p	TCGGGGATCATCATGTCACGAG
bta-miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGTT	bta-miR-543	AAACATTCGCGGTGCACTTCTT
bta-miR-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG	bta-miR-544a	ATTCTGCATTTTTAGCAAGTTC
bta-miR-208a	ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT	bta-miR-544b	ATTCTGCATTTCTAACAAGTTC
bta-miR-208b	ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT	bta-miR-545-3p	ATCAACAAACATTTATTGTGTG
bta-miR-21-3p	AACAGCAGTCGATGGGCTGTCT	bta-miR-545-5p	TCAGTAAATGTTTATTGGATG
bta-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGACT	bta-miR-551a	GCGACCCAATCTTGGTTTCCA
bta-miR-210	ACTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA	bta-miR-551b	GGCGACCCATACTTGGTTTCAG
bta-miR-212	ACCTTGGCTCTAGACTGCTTACT	bta-miR-562	AAAGCAGCTGTACCATTAC

bta-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT	bta-miR-568	ATGTATAAATGTATACACAC
bta-miR-215	ATGACCTATGAATTGACAGACA	bta-miR-574	TGAGTGTGTGTGTGTGAGTGTGTG
bta-miR-216a	TAATCTCAGCTGGCAACTGTGA	bta-miR-584	TGGTTTGCCTGGGACTGAG
bta-miR-216b	AAATCTCTGCAGGCAAATGTGA	bta-miR-592	ATTGTGTCAATATGCGATGATGT
bta-miR-217	TACTGCATCAGGAACTGATTGGAT	bta-miR-599	GTTGTGTCAGTTTATCAAAC
bta-miR-219	AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG	bta-miR-615	GGGGGTCCCCGGTGCTCGGATC
bta-miR-219-3p	AGAATTGTGGCTGGACATCTG	bta-miR-628	ATGCTGACATATTTACTAGAGG
bta-miR-219-5p	TGATTGTCCAAACGCAATTCTT	bta-miR-631	AGACCTGGCTTAGACCTCAGC
bta-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTG	bta-miR-652	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG
bta-miR-22-5p	AGTTCTTCAGTGGCAAGCTTTA	bta-miR-653	GTGTTGAAACAATCTCTGTTG
bta-miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT	bta-miR-654	TATGTCTGCTGACCATCACCTT
bta-miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGT	bta-miR-655	ATAATACATGGTTAACCTCTCT
bta-miR-224	CAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTA	bta-miR-656	AATATTATACAGTCAACCTCT
bta-miR-23b-5p	GGGTTCTGGCATGCTGATTT	bta-miR-658	GGCGGAGGGAAGCGGGTCCGTTGGT
bta-miR-24	GTGCCTACTGAGCTGATATCAGT	bta-miR-660	TACCCATTGCATATCGGAGCTG
bta-miR-26c	AGCCTATCCTGGATTACTTGAA	bta-miR-664a	CAGGCTGGGGTGTGTGTGGATG
bta-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCA	bta-miR-664b	TATTCATTTATCTCCCAGCCTAC
bta-miR-27b	TTCACAGTGGCTAAGTTCTGC	bta-miR-665	ACCAGTAGGCCGAGGCCCT
bta-miR-28	AAGGAGCTCACAGTCTATTGAG	bta-miR-669	TGTGGGTGTGTGCATGTGCGTG
bta-miR-296-3p	GAGGGTTGGGCGGAGGCTTTCC	bta-miR-671	AGGAAGCCCTGGAGGGGCTGGAG
bta-miR-296-5p	GAGGGCCCCCCCCAATCCT	bta-miR-677	CTCACTGATGAGCAGCTTCTGAC
bta-miR-299	TGGTTTACCGTCCACATACAT	bta-miR-7	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTGT
bta-miR-29a	CTAGCACCATCTGAAATCGGTTA	bta-miR-708	AAGGAGCTTACAATCTAGCTGGG
bta-miR-29d-5p	TGACCGATTCTCCTGGTGTT	bta-miR-744	TGCGGGGCTAGGGCTAACAGCA
bta-miR-29e	TAGCATCATTTGAAATCAGTGTTT	bta-miR-758	TTTGTGACCTGGTCCACTAACC
bta-miR-301a	CAGTGCAATAGTATTGTCAAAGCAT	bta-miR-759	GCAGACTGCAAACAATTTTGAC
bta-miR-301b	CAGTGCAATGATATTGTCAAAGCAT	bta-miR-760-3p	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGA
bta-miR-302a	AAGTGCTTCCATGTTTTAGTGA	bta-miR-760-5p	CCCCTCAGTCCACCAGAGCCCCG
bta-miR-30b-3p	CTGGGAGGTGGATGTTTACTT	bta-miR-761	GCAGCAGGGTGAACTGACACA
bta-miR-30e-5p	TGTAAACATCCTTGACTGGAAGCT	bta-miR-763	CCAGCTGGGAGGAACAGTGGC
bta-miR-30f	TGTAAACACCCTACACTCTCAGCT	bta-miR-764	GGTGCTCACTCGTCTTCT
bta-miR-31	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT	bta-miR-767	TGCACCATGGTTGTCTGAGCATG
bta-miR-320a	AAAAGCTGGGTGAGAGGGCGA	bta-miR-769	TGAGACCTCCGGGTCTGAGCT
bta-miR-320b	AGCTGGGTTGAGAGGGTGGT	bta-miR-874	CTGCCCTGGCCCCGAGGGACCGA
bta-miR-323	GCACATTACACGGTCGACCTCT	bta-miR-876	TGGATTTCTTTGTGAATCACCA
bta-miR-324	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT	bta-miR-877	GTAGAGGAGATGGCGCAGGG
bta-miR-326	CCTCTGGGCCCTTCTCCAG	bta-miR-885	TCCATTACACTACCCTGCCTCT
bta-miR-328	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGT	bta-miR-9-3p	ATAAAGCTAGATAACCG
bta-miR-329a	AACACACCTGGTTAACCTTTTT	bta-miR-9-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG
bta-miR-329b	AGAGGTTTTCTGGGTTTCTGTTT	bta-miR-935	CCAGTTACCGCTTCCGCTACCGC
bta-miR-331-3p	GCCCCTGGGCCTATCCTAGAA	bta-miR-940	AAGGCTGGGCCCCCGCTCCGC
bta-miR-331-5p	TCTAGGTATGGTCCCAGG	bta-miR-95	TCAACGGGTATTTATTGAGCA
bta-miR-335	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT	bta-miR-98	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT

bta-miR-338	TCCAGCATCAGTGATTTTGTTGA	bta-miR-99a-3p	CAAGCTCGCTTCTATGGGT
bta-miR-339a	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTCAC	bta-miR-99a-5p	AACCCGTAGATCCGATCTTGT
bta-miR-339b	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTC	RNU43 snoRNA	CTTATTGACGGGCGGACAGAAAC
bta-miR-340	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGCC	Hm/Ms/Rt U1 snRNA	CGACTGCATAATTTGTGGTAGTGG
bta-miR-342	TCTCACACAGAAATCGCACCCATCT	bta-miR-99b	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG
bta-miR-345-3p	CCTGAACTAGGGGTCTGGAG		

APÊNDICE G. Similaridade entre os miRNAs maduros humanos e bovinos utilizados no Estudo 4.

Bovino	Sequência	Humano	Sequência	Homologia
bta-let-7a-3p	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	hsa-let-7a-3p	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	100,00
bta-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	100,00
bta-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	hsa-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	100,00
bta-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	100,00
bta-let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	100,00
bta-let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU	hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	95,45
bta-let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	100,00
bta-let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	100,00
bta-let-7i	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU	hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU	100,00
bta-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	hsa-miR-1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	100,00
bta-miR-100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	hsa-miR-100-5p	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	100,00
bta-miR-101	UACAGUACUGUAUACUGAA	hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUAUACUGAA	100,00
bta-miR-103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	100,00
bta-miR-105a	UCAAUUGCUCAGACUCCUGUGGU	hsa-miR-105-5p	UCAAUUGCUCAGACUCCUGUGGU	100,00
bta-miR-105b	UCAAUUGCUCAGACUCCUGUGGU	hsa-miR-105-5p	UCAAUUGCUCAGACUCCUGUGGU	95,65
bta-miR-106a	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA	hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA	95,65
bta-miR-106b	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	hsa-miR-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	100,00
bta-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC	hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC	95,65
bta-miR-10a	UACCCUGUAGAUCCGAUUUGUG	hsa-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCCGAUUUGUG	100,00
bta-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	100,00
bta-miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	hsa-miR-22-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	100,00
bta-miR-124a	UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	hsa-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGGCC	86,95
bta-miR-124b	UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	hsa-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGGCC	100,00
bta-miR-125a	UCCCUAGAGACCCUUAACUGUG	hsa-miR-125a-5p	UCCCUAGAGACCCUUAACUGUGA	95,62
bta-miR-125b	UCCCUAGAGACCCUUAACUGUGA	hsa-miR-125b-5p	UCCCUAGAGACCCUUAACUGUGA	100,00
bta-miR-126-3p	CGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	95,62
bta-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	hsa-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	100,00
bta-miR-127	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	100,00
bta-miR-128	UCACAGUGAACCGUCUCUUU	hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGUCUCUUU	100,00
bta-miR-129	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCU	hsa-miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC	100,00
bta-miR-129-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAGCAU	hsa-miR-129-2-3p	AAGCCCUUACCCCAAAAGCAU	100,00
bta-miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCU	hsa-miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC	100,00
bta-miR-130a	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU	hsa-miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU	100,00
bta-miR-130b	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	100,00
bta-miR-132	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	hsa-miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	100,00
bta-miR-133a	UUUGGUCCCCUUAACACGUG	hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACACGUG	100,00
bta-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACACGCUA	hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACACGCUA	100,00
bta-miR-133c	AUUUGGUUCCAUUUUACCAGC	hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACACGCUA	72,72
bta-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGUGG	hsa-miR-134-5p	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	95,45

bta-miR-135a	UAUGGCUUUUUAUCCUAUGUGA	hsa-miR-135a-5p	UAUGGCUUUUUAUCCUAUGUGA	100,00
bta-miR-135b	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA	hsa-miR-135b-5p	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA	100,00
bta-miR-136	ACUCCAUUUGUUUGAUGAUGGA	hsa-miR-136-5p	ACUCCAUUUGUUUGAUGAUGGA	100,00
bta-miR-137	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	hsa-miR-137	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	100,00
bta-miR-138	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	hsa-miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	100,00
bta-miR-139	UCUACAGUGCACGUGUCCAGU	hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCCAGU	100,00
bta-miR-140	UACCACAGGGUAGAACCACGGA	hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGGA	95,45
bta-miR-141	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	100,00
bta-miR-142-3p	AGUGUUUCCUACUUUAUGGAUG	hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	86,95
bta-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUAC	hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	95,23
bta-miR-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCG	hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	95,65
bta-miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACUAG	hsa-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUGUACU	90,90
bta-miR-145	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU	100,00
bta-miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUAGGUUGU	hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUAGGGUU	87,50
bta-miR-146b	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCUGU	hsa-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU	91,30
bta-miR-147	GUGUGCGGAAUUGCUUCUGCUA	hsa-miR-147a	GUGUGUGGAAUUGCUUCUGC	86,36
bta-miR-148a	UCAGUGCACUACAGAAUUUGU	hsa-miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAAUUUGU	100,00
bta-miR-148b	UCAGUGCAUCACAGAAUUUGU	hsa-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAAUUUGU	100,00
bta-miR-149-3p	GAGGGAGGGACGGGGCUGUGC	hsa-miR-149-3p	AGGGAGGGACGGGGCUGUGC	95,45
bta-miR-149-5p	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	hsa-miR-149-5p	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	100,00
bta-miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUGU	hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	95,65
bta-miR-151-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	100,00
bta-miR-151-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	100,00
bta-miR-152	UCAGUGCAUGACAGAAUUGGG	hsa-miR-152-3p	UCAGUGCAUGACAGAAUUGG	95,45
bta-miR-153	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC	hsa-miR-153-3p	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC	100,00
bta-miR-154a	UAGGUUAUCCGUGUAGCCUUCG	hsa-miR-154-5p	UAGGUUAUCCGUGUAGCCUUCG	95,45
bta-miR-154b	AGAGGUCUCCAUUGGUGCAUUCG	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-154c	AGAUAUUGCACGGUUGAUCUCU	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-155	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	100,00
bta-miR-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUUGU	hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGGUUUUGU	95,45
bta-miR-15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	100,00
bta-miR-16a	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGUG	hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	95,45
bta-miR-16b	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGC	hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	95,45
bta-miR-17-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGU	hsa-miR-17-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	90,90
bta-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU	hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	95,83
bta-miR-181a	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU	hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	95,83
bta-miR-181b	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGUU	hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	95,83
bta-miR-181c	AACAUUCAACUGUCGGUGAGUUU	hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACUGUCGGUGAGU	91,66
bta-miR-181d	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	hsa-miR-181d-5p	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	100,00
bta-miR-182	UUUGGCAUUGGUAGAACUCACACU	hsa-miR-182-5p	UUUGGCAUUGGUAGAACUCACACU	100,00
bta-miR-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACUG	hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	95,65
bta-miR-184	UGGACGGAGAACUGUAAGGGU	hsa-miR-184	UGGACGGAGAACUGUAAGGGU	100,00
bta-miR-185	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA	hsa-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA	100,00

bta-miR-186	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	100,00
bta-miR-187	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	hsa-miR-187-3p	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	100,00
bta-miR-188	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGU	hsa-miR-188-5p	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG	95,45
bta-miR-18a	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUUA	hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	95,65
bta-miR-18b	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUA	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUA	95,65
bta-miR-190a	UGAU AUGUUUGAUUAUUAGGU	hsa-miR-190a-5p	UGAU AUGUUUGAUUAUUAGGU	100,00
bta-miR-190b	UGAU AUGUUUGAUUAUUGGGUU	hsa-miR-190b	UGAU AUGUUUGAUUAUUGGGUU	100,00
bta-miR-191	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	100,00
bta-miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCCAG	hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	91,30
bta-miR-193a	GGGACUUUGUAGGCCAGUU	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	has-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	100,00
bta-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	100,00
bta-miR-193b	AACUGGCCACAAAGUCCCGUUU	hsa-miR-193b-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCCGCU	87,50
bta-miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	hsa-miR-194-5p	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	100,00
bta-miR-195	UAGCAGCACAGAAUAUUGGCA	hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	95,45
bta-miR-196a	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	hsa-miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	100,00
bta-miR-196b	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGGA	hsa-miR-196b-5p	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	95,65
bta-miR-197	UUCACCACCUUCCACCCAGC	hsa-miR-197-3p	UUCACCACCUUCCACCCAGC	100,00
bta-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUGGUUA	hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUGGUUA	100,00
bta-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUU	hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	95,65
bta-miR-199b	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	hsa-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	100,00
bta-miR-199c	UACAGUAGUCUGCACAUGGG	hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUGGUUA	86,36
bta-miR-19a	UGUGCAAUCUAUGCAAAACUGA	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUCUAUGCAAAACUGA	100,00
bta-miR-19b	UGUGCAAUCCAUGCAAAACUGA	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAAAACUGA	100,00
bta-miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGUU	hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	95,65
bta-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUG	hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	95,45
bta-miR-200c	UAAUACUGCCGGGUAUUGAUGGA	hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAUUGAUGGA	100,00
bta-miR-202	UUCCU AUGCAUAUACUUCUUU	hsa-miR-202-5p	UUCCU AUGCAUAUACUUCUUUG	95,45
bta-miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCU AUGCCU	hsa-miR-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCU AUGCCU	100,00
bta-miR-205	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	100,00
bta-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	100,00
bta-miR-208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	hsa-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	100,00
bta-miR-208b	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU	hsa-miR-208b-3p	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU	100,00
bta-miR-20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	100,00
bta-miR-20b	CAAAGUGCUCACAGUGCAGGUUA	hsa-miR-20b-5p	CAAAGUGCUCUAGUGCAGGUAG	91,30
bta-miR-21-3p	AACAGCAGUCGAUGGGCUGUCU	hsa-miR-21-3p	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	81,81
bta-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACU	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	91,66
bta-miR-210	ACUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	91,45
bta-miR-211	UUCCCUUUGUCAUCCUUGCC	hsa-miR-211-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUUGCCU	90,90
bta-miR-212	ACCUUGGCUCUAGACUGCUUACU	hsa-miR-212-5p	ACCUUGGCUCUAGACUGCUUACU	100,00
bta-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	100,00
bta-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGACA	hsa-miR-215-5p	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	95,45
bta-miR-216a	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	hsa-miR-216a-5p	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	100,00

bta-miR-216b	AAAUUCUCUGCAGGCAAUGUGA	hsa-miR-216b-5p	AAAUUCUCUGCAGGCAAUGUGA	100,00
bta-miR-217	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGAU	hsa-miR-217	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGA	95,83
bta-miR-218	UUGUGCUUGAUUAACCAUGUG	hsa-miR-218-5p	UUGUGCUUGAUUAACCAUGU	95,45
bta-miR-219	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCCG	hsa-miR-219a-1-3p	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCCG	100,00
bta-miR-219-3p	AGAAUUGUGGCUGGACAUCUG	hsa-miR-219a-2-3p	AGAAUUGUGGCUGGACAUCUGU	95,45
bta-miR-219-5p	UGAUUGUCCAACGCAAUUCUU	hsa-miR-219a-5p	UGAUUGUCCAACGCAAUUCU	95,45
bta-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUG	hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	95,45
bta-miR-22-5p	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA	hsa-miR-22-5p	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA	100,00
bta-miR-221	AGCUACAUUGUCUGUGGUUU	hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGUGGUUUU	95,65
bta-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	100,00
bta-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAUACCCCA	hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAUACCCCA	100,00
bta-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUA	hsa-miR-224-5p	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	91,30
bta-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCCA	hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	95,45
bta-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACCAC	hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	91,30
bta-miR-23b-5p	GGGUUCCUGGCAUGCUGAUUU	hsa-miR-23b-5p	GGGUUCCUGGCAUGCUGAUUU	95,45
bta-miR-24	GUGCCUACUGAGCUGAUUACAGU	hsa-miR-24-1-5p	UGCCUACUGAGCUGAUUACAGU	95,65
bta-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	100,00
bta-miR-25	CAUUGCACUUGUCUGGUCUGA	hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUGGUCUGA	100,00
bta-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	100,00
bta-miR-26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU	hsa-miR-26b-5p	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	95,45
bta-miR-26c	AGCCUAUCCUGGAUUACUUGAA	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCGG	hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCGGC	95,23
bta-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	hsa-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	100,00
bta-miR-27b	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	100,00
bta-miR-28	AAGGAGCUCACAGUCUUAUUGAG	hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUCUUAUUGAG	100,00
bta-miR-296-3p	GAGGGUUGGGCGGAGGCUUCC	hsa-miR-296-3p	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC	90,90
bta-miR-296-5p	GAGGGCCCCCCCCAAUCCU	hsa-miR-296-5p	AGGGCCCCCCCCAAUCCUGU	80,95
bta-miR-299	UGGUUUACCGUCCCAUACA	hsa-miR-299-5p	UGGUUUACCGUCCCAUACA	100,00
bta-miR-29a	CUAGCACCAUCUGAAUUCGGUUA	hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAUUCGGUUA	21,74
bta-miR-29b	UAGCACCAUUUGAAUUCAGUGUU	hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAUUCAGUGUU	100,00
bta-miR-29c	UAGCACCAUUUGAAUUCGGUUA	hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAUUCGGUUA	100,00
bta-miR-29d-3p	UAGCACCAUUUGAAUUCGAUUA	hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAUUCGGUUA	95,45
bta-miR-29d-5p	UGACCGAUUUCUCCUGGUGUU	hsa-miR-29c-5p	UGACCGAUUUCUCCUGGUGUUC	95,45
bta-miR-29e	UAGCAUCAUUUGAAUUCAGUGUUU	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-301a	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGCAU	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC	92,00
bta-miR-301b	CAGUGCAAUGAUUUGUCAAGCAU	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC	91,66
bta-miR-302a	AAGUGCUUCCAUGUUUUGUGA	hsa-miR-302a-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGUGA	91,30
bta-miR-302b	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGUAG	hsa-miR-302b-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGUAG	100,00
bta-miR-302c	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	hsa-miR-302c-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	100,00
bta-miR-302d	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGUAGU	hsa-miR-302d-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGAGUGU	86,36
bta-miR-3064	UUGCCACACUGCAACACCUUACA	hsa-miR-3064-3p	UUGCCACACUGCAACACCUUACA	100,00
bta-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCGACUGGAAGCU	hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG	91,66
bta-miR-30b-3p	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC	hsa-miR-30b-3p	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC	95,45

bta-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUACACUCAGCU	hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCUACACUCAGCU	100,00
bta-miR-30c	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC	hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC	100,00
bta-miR-30d	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAGCU	hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG	91,66
bta-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUGACUGGAAGCU	hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG	91,66
bta-miR-30f	UGUAAACACCUACACUCUCAGCU	hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC	91,66
bta-miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	100,00
bta-miR-32	UAUUGCACAUAGACUAAGUUGCAU	hsa-miR-32-5p	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA	91,30
bta-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGGCGA	hsa-miR-320a	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGGCGA	100,00
bta-miR-320b	AGCUGGGUUGAGAGGGUGGU	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-323	GCACAUUACACGGUCGACCUCU	hsa-miR-323a-3p	CACAUUACACGGUCGACCUCU	95,45
bta-miR-324	CGCAUCCCUAGGGCAUUGGUGU	hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCUAGGGCAUUGGUGU	100,00
bta-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	hsa-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	100,00
bta-miR-328	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	hsa-miR-328-3p	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	100,00
bta-miR-329a	AACACACCUGGUUAACCUUUUU	hsa-miR-329-3p	AACACACCUGGUUAACCUUUUU	95,24
bta-miR-329b	AGAGGUUUUCUGGGUUCUGUUUU	hsa-miR-329-5p	GAGGUUUUCUGGGUUCUGUUUU	95,65
bta-miR-330	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA	hsa-miR-330-3p	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA	100,00
bta-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	100,00
bta-miR-331-5p	UCUAGGU AUGGUCCCAGG	hsa-miR-331-5p	CUAGGU AUGGUCCCAGGGAUCC	77,27
bta-miR-335	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	100,00
bta-miR-338	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA	hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	95,65
bta-miR-339a	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCAC	hsa-miR-339-5p	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	95,65
bta-miR-339b	UCCUGUCCUCCAGGAGCUC	hsa-miR-339-5p	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	86,95
bta-miR-33a	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	hsa-miR-33a-5p	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	100,00
bta-miR-33b	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC	hsa-miR-33b-5p	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC	100,00
bta-miR-340	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGCC	hsa-miR-340-3p	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC	100,00
bta-miR-342	UCUCACACAGAAAUCGACCCAUUCU	hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGACCCGU	95,65
bta-miR-345-3p	CCUGAACUAGGGGUCUGGAG	hsa-miR-345-3p	GCCUGAACGAGGGGUCUGGAG	86,36
bta-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGUGCU	hsa-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	90,90
bta-miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCGCCUCU	hsa-miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCGCCUCU	100,00
bta-miR-34a	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU	hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU	100,00
bta-miR-34b	AGGCAGUGUAAUAGCUGAUUG	hsa-miR-34b-5p	UAGGCAGUGUAAUAGCUGAUUG	13,04
bta-miR-34c	AGGCAGUGUAGUAGCUGAUUG	hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUAGCUGAUUGC	96,65
bta-miR-361	UUAUCAGAAUCCAGGGGUAC	hsa-miR-361-5p	UUAUCAGAAUCCAGGGGUAC	100,00
bta-miR-362-3p	AACACACCUAUUCAAGGAUUC	hsa-miR-362-3p	AACACACCUAUUCAAGGAUUC	95,65
bta-miR-362-5p	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAGU	hsa-miR-362-5p	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAGU	100,00
bta-miR-363	AUUGCACGGUAUCCAUCUGCG	hsa-miR-363-3p	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA	86,36
bta-miR-365-3p	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU	hsa-miR-365a-3p	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU	100,00
bta-miR-365-5p	AGGGACUUUUGGGGGCAGAUUG	hsa-miR-365a-5p	AGGGACUUUUGGGGGCAGAUUG	100,00
bta-miR-367	GAAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA	hsa-miR-367-3p	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA	95,65
bta-miR-369-3p	AAUAAUACAUGGUUGAUCUUU	hsa-miR-369-3p	AAUAAUACAUGGUUGAUCUUU	100,00
bta-miR-369-5p	AUCGACCGUGUUUAUUCGC	hsa-miR-369-5p	AGAUCGACCGUGUUUAUUCGC	90,90
bta-miR-370	GCCUGCUGGGUGGAACCUUGGU	hsa-miR-370-3p	GCCUGCUGGGUGGAACCUUGGU	100,00
bta-miR-371	AAGUGCCGCCAUGUUUUGAGUGU	hsa-miR-371a-3p	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUUGU	83,33

bta-miR-374a	UUUAUAAUACAACCGUAAGUG	hsa-miR-374a-5p	UUUAUAAUACAACCGUAAGUG	100,00
bta-miR-374b	AUAUAAUACAACCGCUAAGUG	hsa-miR-374b-5p	AUAUAAUACAACCGCUAAGUG	100,00
bta-miR-375	UUUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	hsa-miR-375	UUUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	100,00
bta-miR-376a	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	hsa-miR-376a-3p	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	100,00
bta-miR-376b	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUU	hsa-miR-376b-3p	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUU	100,00
bta-miR-376c	GUGGAUUAUCCUUCUAUGUUUA	hsa-miR-376c-5p	GGUGGAUUAUCCUUCUAUGUU	95,23
bta-miR-376d	AUCAUAGAGGAAAAUCCACAU	hsa-miR-376a-3p	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	95,45
bta-miR-376e	AACAUAGAGGAAAAUCCACAUU	hsa-miR-376c-3p	AACAUAGAGGAAAAUCCACGU	86,36
bta-miR-377	AUCACACAAGGCAACUUUUGU	hsa-miR-377-3p	AUCACACAAGGCAACUUUUGU	100,00
bta-miR-378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	100,00
bta-miR-378b	ACUUGACUUGGAGUCAGAAGGC	hsa-miR-378b	ACUGGACUUGGAGGCAGAA	77,27
bta-miR-378c	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGU	hsa-miR-378c	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGAGUGG	80,00
bta-miR-378d	CUGGACUUGGAGUCAGAAGACC	hsa-miR-378d	ACUGGACUUGGAGUCAGAAA	77,27
bta-miR-379	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	hsa-miR-379-5p	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	100,00
bta-miR-380-3p	UAUGUAAUGUGGCCACGUCU	hsa-miR-380-3p	UAUGUAAUUGGUCCACUCUU	83,36
bta-miR-380-5p	UGGUUGACCAUAGAACAUGC GC	hsa-miR-380-5p	UGGUUGACCAUAGAACAUGC GC	100,00
bta-miR-381	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUGU	hsa-miR-381-3p	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUGU	100,00
bta-miR-382	GAAGUUGUUCGUGGGAUUCG	hsa-miR-382-5p	GAAGUUGUUCGUGGGAUUCG	100,00
bta-miR-383	AGAUACAAGGUGAUUGUGGCU	hsa-miR-383-5p	AGAUACAAGGUGAUUGUGGCU	100,00
bta-miR-409a	AGGUUACCCGAGCAACUUUGCAU	hsa-miR-409-5p	AGGUUACCCGAGCAACUUUGCAU	100,00
bta-miR-409b	GGGUUACCCGAGCAACAUC	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-410	AAUAUAAACAGAUUGGCCUGU	hsa-miR-410-3p	AAUAUAAACAGAUUGGCCUGU	100,00
bta-miR-411a	AUAGUAGACCGUAUAGCGUACG	hsa-miR-411-5p	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG	95,45
bta-miR-411b	UGGUCGACCAUAAAACGUACGU	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-411c-3p	UGUAUGUACAACGAUCCACAGU	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-411c-5p	GGUUGAUCAGAGAACAUAUUAU	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-412	ACUUCACCGUGGCCACUAGCUGU	hsa-miR-412-3p	ACUUCACCGUGGCCACUAGCCGU	95,65
bta-miR-421	AUCAACAGACAUUAUUGGGCGC	hsa-miR-421	AUCAACAGACAUUAUUGGGCGC	100,00
bta-miR-423-3p	AAGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	95,83
bta-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	100,00
bta-miR-424-3p	CAAAACGUGAGGCGCUCUAU	hsa-miR-424-3p	CAAAACGUGAGGCGCUCUAU	100,00
bta-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGA	hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	95,45
bta-miR-425-3p	AUCGGGAUUGUCGUGCCGCC	hsa-miR-425-3p	AUCGGGAUUGUCGUGCCGCC	100,00
bta-miR-425-5p	AUGACACGAUCACUCCGUUGA	hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCGUUGA	95,65
bta-miR-429	UAAUACUGUCUGGUAUAGCCGU	hsa-miR-429	UAAUACUGUCUGGUAUAAACCGU	90,90
bta-miR-431	UGUCUUGCAGGCCGUAUCAGG	hsa-miR-431-5p	UGUCUUGCAGGCCGUAUGCA	95,65
bta-miR-432	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	hsa-miR-432-5p	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	100,00
bta-miR-433	AUCAUGAUGGGCUCCUGGUGU	hsa-miR-433-3p	AUCAUGAUGGGCUCCUGGUGU	100,00
bta-miR-448	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCAU	hsa-miR-448	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCAU	100,00
bta-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU	hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU	100,00
bta-miR-449b	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC	hsa-miR-449b-5p	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC	100,00
bta-miR-449c	AGGCAGUGCAUCUCUAGCUGG	hsa-miR-449c-5p	UAGGCAGUGUAUUGCUAGCGCUGU	60,00
bta-miR-449d	GAAGGCUGUGCUGUGGAG	Não encontrado	Não encontrado	

bta-miR-450a	UUUUGCGAUGUGUCCUAAUUAU	hsa-miR-450a-5p	UUUUGCGAUGUGUCCUAAUUAU	100,00
bta-miR-450b	UUUUGCAAUAUGUCCUGAAUA	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-451	AAACCGUUACCAUACUGAGUUU	hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUACUGAGUU	95,65
bta-miR-452	UGUUUGCAGAGGAAACUGAGAC	hsa-miR-452-5p	AACUGUUUGCAGAGGAAACUGA	86,36
bta-miR-4523	GACCGAGAGGGCCUCGGCUGU	hsa-miR-4523	GACCGAGAGGGCCUCGGCUGU	100,00
bta-miR-453	AGGUUGUCCGUGGUGAGUUCGCA	hsa-miR-323b-5p	AGGUUGUCCGUGGUGAGUUCGCA	100,00
bta-miR-454	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU	hsa-miR-454-3p	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU	100,00
bta-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUUAACACU	hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUUAACAC	95,45
bta-miR-455-5p	UAUGUGCCUUUGGACUACAUC	hsa-miR-455-5p	UAUGUGCCUUUGGACUACAUCG	95,45
bta-miR-483	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU	hsa-miR-483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU	100,00
bta-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCUCCCGAU	hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCUCCCGAU	100,00
bta-miR-485	AGAGGCGUGCCGUGAUGAAUUCG	hsa-miR-485-5p	AGAGGCGUGCCGUGAUGAAUUC	95,65
bta-miR-486	UCCUGUACUGAGCUGCCCGAG	hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCGAG	100,00
bta-miR-487a	AAUCAUACAGGGACAUCAGU	hsa-miR-487a-3p	AAUCAUACAGGGACAUCAGUU	95,45
bta-miR-487b	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	hsa-miR-487b-3p	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	100,00
bta-miR-488	UUGAAAGGCUUUCUUGGUC	hsa-miR-488-3p	UUGAAAGGCUUUCUUGGUC	95,23
bta-miR-489	GUGACAUACAUAUUGGCGAC	hsa-miR-489-3p	GUGACAUACAUAUACGGCAGC	86,36
bta-miR-490	CAACCGGAGGACUCCAUGCUG	hsa-miR-490-3p	CAACCGGAGGACUCCAUGCUG	100,00
bta-miR-491	AGUGGGGAACCCUCCAUGAGG	hsa-miR-491-5p	AGUGGGGAACCCUCCAUGAGG	100,00
bta-miR-493	UGAAGGUCUACUGUGGCCAGG	hsa-miR-493-3p	UGAAGGUCUACUGUGGCCAGG	100,00
bta-miR-494	UGAAACAUAACGGGAAACCUC	hsa-miR-494-3p	UGAAACAUAACGGGAAACCUC	100,00
bta-miR-495	AAACAAACAUGGUGCACUUCUU	hsa-miR-495-3p	AAACAAACAUGGUGCACUUCUU	100,00
bta-miR-496	UGAGUAUUAUAGGCCAAUCUC	hsa-miR-496	UGAGUAUUAUAGGCCAAUCUC	100,00
bta-miR-497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA	hsa-miR-497-5p	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU	95,45
bta-miR-499	UUAAGACUUGCAGUGAUUUU	hsa-miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUUUU	100,00
bta-miR-500	UAAUCCUUGCUACCUGGGUGAGA	hsa-miR-500a-5p	UAAUCCUUGCUACCUGGGUGAGA	100,00
bta-miR-502a	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUA	hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUA	100,00
bta-miR-502b	AAUCCACCUGGGCAAGGAUUC	hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUA	90,47
bta-miR-503-3p	GGAGUAUUGUUUCUGCUGCCCGG	hsa-miR-503-3p	GGGGUAUUGUUUCCGUGCCAGG	86,95
bta-miR-503-5p	UAGCAGCGGGAACAGUACUG	hsa-miR-503-5p	UAGCAGCGGGAACAGUUCGAG	80,95
bta-miR-504	AGACCCUGGUCUGCACUCUAG	hsa-miR-504-5p	AGACCCUGGUCUGCACUCUAG	95,45
bta-miR-505	CGUCAACACUUGCUGGUUCCU	hsa-miR-505-3p	CGUCAACACUUGCUGGUUCCU	100,00
bta-miR-532	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	100,00
bta-miR-539	GGAGAAAUUAUCCUUGGUGUGU	hsa-miR-539-5p	GGAGAAAUUAUCCUUGGUGUGU	100,00
bta-miR-541	UGGUGGGCACAGAAUCCGCCU	hsa-miR-541-3p	UGGUGGGCACAGAAUUGGACU	90,90
bta-miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGACGAG	hsa-miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGACGAGA	95,65
bta-miR-543	AAACAUCGCGGUGCACUUCUU	hsa-miR-543	AAACAUCGCGGUGCACUUCUU	100,00
bta-miR-544a	AUUCUGCAUUUUAGCAAGUUC	hsa-miR-544a	AUUCUGCAUUUUAGCAAGUUC	100,00
bta-miR-544b	AUUCUGCAUUUUAACAAGUUC	hsa-miR-544a	AUUCUGCAUUUUAGCAAGUUC	90,90
bta-miR-545-3p	AUCAACAACAUUAUUGUGUG	hsa-miR-545-3p	UCAGCAAACAUAUUAUUGUGGC	86,36
bta-miR-545-5p	UCAGUAAAUGUUUAUUGGAUG	hsa-miR-545-5p	UCAGUAAAUGUUUAUAGAUGA	90,90
bta-miR-551a	GCGACCCAUCUUGGUUUCCA	hsa-miR-551a	GCGACCCAUCUUGGUUUCCA	95,23
bta-miR-551b	GGCGACCAUACUUGGUUUCAG	hsa-miR-551b-3p	GCGACCCAUACUUGGUUUCAG	100,00

bta-miR-562	AAAGCAGCUGUACCAUUUAC	hsa-miR-562	AAAGUAGCUGUACCAUUUGC	90,00
bta-miR-568	AUGUAUAAAUGUAUACACAC	hsa-miR-568	AUGUAUAAAUGUAUACACAC	100,00
bta-miR-574	UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGUG	hsa-miR-574-5p	UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU	95,83
bta-miR-582	UUACAGUUGUUAACCAUUACU	hsa-miR-582-5p	UUACAGUUGUUAACCAUUACU	100,00
bta-miR-584	UGGUUUGCCUGGGACUGAG	hsa-miR-584-5p	UUUUGGUUUGCCUGGGACUGAG	86,36
bta-miR-592	AUUGUGUCAAUUGCGAUGAUGU	hsa-miR-592	UUGUGUCAAUUGCGAUGAUGU	95,65
bta-miR-599	GUUGUGUCAGUUUAUCAAAC	hsa-miR-599	GUUGUGUCAGUUUAUCAAAC	100,00
bta-miR-615	GGGGGUCCCCGGUGCUCGGAUC	hsa-miR-615-5p	GGGGGUCCCCGGUGCUCGGAUC	100,00
bta-miR-628	AUGCUGACAUAUUUACUAGAGG	hsa-miR-628-5p	AUGCUGACAUAUUUACUAGAGG	100,00
bta-miR-631	AGACCUGGCUUAGACCUAGC	hsa-miR-631	AGACCUGGCCAGACCUAGC	90,47
bta-miR-652	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	hsa-miR-652-3p	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	100,00
bta-miR-653	GUGUUGAAACAUCUCUGUUG	hsa-miR-653-5p	GUGUUGAAACAUCUCUACUG	90,47
bta-miR-654	UAUGUCUGCUGACCAUACCCU	hsa-miR-654-3p	UAUGUCUGCUGACCAUACCCU	100,00
bta-miR-655	AUAAUACAUGGUUAACCUUCU	hsa-miR-655-3p	AUAAUACAUGGUUAACCUUUU	95,45
bta-miR-656	AAUUAUUAACAGUCAACCUCU	hsa-miR-656-3p	AAUUAUUAACAGUCAACCUCU	100,00
bta-miR-658	GGCGGAGGGAAGCGGUCCGUUGGU	hsa-miR-658	GGCGGAGGGAAGUAGGUCCGUUGGU	92,00
bta-miR-660	UACCAUUGCAUAUCGGAGCUG	hsa-miR-660-5p	UACCAUUGCAUAUCGGAGUUG	95,45
bta-miR-664a	CAGGCUGGGGUGUGUGUGGAUG	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-664b	UAUUCAUUUAUCUCCAGCCUAC	hsa-miR-664b-3p	UUCAUUUGCCUCCAGCCUACA	82,60
bta-miR-665	ACCAGUAGGCCGAGGCCCU	hsa-miR-665	ACCAGGAGGCUGAGGCCCU	90,00
bta-miR-669	UGUGGGUGUGUGCAUGUGCGUG	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-670	UCCUGAGUAUAUGUGUGAA	hsa-miR-670-3p	UUUCCCAUAUAUUCAGGA	Sem similaridade
bta-miR-671	AGGAAGCCUGGAGGGGUGGAG	hsa-miR-671-5p	AGGAAGCCUGGAGGGGUGGAG	100,00
bta-miR-677	CUCACUGAUGAGCAGCUUCUGAC	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-7	UGGAAGACUAGUAUUUGUUGUU	hsa-miR-7-5p	UGGAAGACUAGUAUUUGUUGU	95,83
bta-miR-708	AAGGAGCUUACAUCUAGCUGGG	hsa-miR-708-5p	AAGGAGCUUACAUCUAGCUGGG	100,00
bta-miR-744	UGC GGGGCUAGGGCUAACAGCA	hsa-miR-744-5p	UGC GGGGCUAGGGCUAACAGCA	100,00
bta-miR-758	UUUGUGACCUUGUCCACUAACC	hsa-miR-758-3p	UUUGUGACCUUGUCCACUAACC	100,00
bta-miR-759	GCAGACUGCAAACAUUUUGAC	hsa-miR-759	GCAGAGUGCAAACAUUUUGAC	95,45
bta-miR-760-3p	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	hsa-miR-760	CGGCUCUGGGUCUGUGGGGA	100,00
bta-miR-760-5p	CCCCUAGUCCACCAGAGCCCG	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-761	GCAGCAGGGUGAAACUGACACA	hsa-miR-761	GCAGCAGGGUGAAACUGACACA	100,00
bta-miR-763	CCAGCUGGGAGGAACCAGUGGC	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-764	GGUGCUCACUCGUCCUUCU	hsa-miR-764	GCAGGUGCUCACUUGUCCUCCU	77,27
bta-miR-767	UGCACCAUGGUUGUCUGAGCAUG	hsa-miR-767-5p	UGCACCAUGGUUGUCUGAGCAUG	100,00
bta-miR-769	UGAGACCUCCGGUUCUGAGCU	hsa-miR-769-5p	UGAGACCUUGGGUUCUGAGCU	95,45
bta-miR-873	GCAGGAACUUGUGAGUCUCCU	hsa-miR-873-5p	GCAGGAACUUGUGAGUCUCCU	100,00
bta-miR-874	CUGCCUGGCCGAGGGACCGA	hsa-miR-874-3p	CUGCCUGGCCGAGGGACCGA	100,00
bta-miR-875	UAUACCUAGUUUAUCAGGUG	hsa-miR-875-5p	UAUACCUAGUUUAUCAGGUG	100,00
bta-miR-876	UGGAUUUCUUUGUGAAUCACCA	hsa-miR-876-5p	UGGAUUUCUUUGUGAAUCACCA	100,00
bta-miR-877	GUAGAGGAGAUUGGCGAGGG	hsa-miR-877-5p	GUAGAGGAGAUUGGCGAGGG	100,00
bta-miR-885	UCCAUAACACUACCCUGCCUCU	hsa-miR-885-5p	UCCAUAACACUACCCUGCCUCU	100,00
bta-miR-9-3p	AUAAAGCUAGAUAAACCG	hsa-miR-9-3p	AUAAAGCUAGAUAAACGAAAGU	72,27

bta-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG	hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	95,65
bta-miR-92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	100,00
bta-miR-92b	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	100,00
bta-miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUA	hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUA	95,65
bta-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC	hsa-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC	100,00
bta-miR-940	AAGGCGGGCCCCCGCUCGCC	hsa-miR-940	AAGGCGGGCCCCCGCUCCCC	90,47
bta-miR-95	UUCAACGGGUAUUUAUUGAGCA	hsa-miR-95-3p	UUCAACGGGUAUUUAUUGAGCA	100,00
bta-miR-96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	hsa-miR-96-5p	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	100,00
bta-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	hsa-miR-98-5p	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	100,00
bta-miR-99a-3p	CAAGCUCGCUUCUAUGGGU	hsa-miR-99a-3p	CAAGCUCGCUUCUAUGGGUCUG	86,36
bta-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGU	hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	95,45
bta-miR-99b	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	100,00
bta-miR-1179	AAGCAUUCUUCAUUGGUUGG	hsa-miR-1179	AAGCAUUCUUCAUUGGUUGG	100,00
bta-miR-1185	AGAGGAUACCCUUUGUAUGUU	hsa-miR-1185-5p	AGAGGAUACCCUUUGUAUGUU	100,00
bta-miR-1193	UAGGUCACCCGUUUGACUAUC	Não encontrado	Não encontrado	
bta-miR-1197	UAGGACACAUGGUCUACUUCU	hsa-miR-1197	UAGGACACAUGGUCUACUUCU	100,00
bta-miR-1224	GUGAGGACUCGGGAGGUGGAG	hsa-miR-1224-5p	GUGAGGACUCGGGAGGUGG	90,47
bta-miR-1225-3p	CCGAGCCCCUGUGCCGCCCCAG	hsa-miR-1225-3p	UGAGCCCCUGUGCCGCCCCAG	91,30
bta-miR-1246	AAUGGAUUUUUGGAGCAGG	hsa-miR-1246	AAUGGAUUUUUGGAGCAGG	100,00
bta-miR-1247-3p	CGGGAACGUCGGGACUGGAGC	hsa-miR-1247-3p	CCCCGGGAACGUCGAGACUGGAGC	82,60
bta-miR-1247-5p	ACCCGUCCCGUGGUCGCCGGA	hsa-miR-1247-5p	ACCCGUCCCGUUCGUCGCCGGA	95,45
bta-miR-1248	ACCUUCUUGUAUAAGCACUGUCUAAA	hsa-miR-1248	ACCUUCUUGUAUAAGCACUGUCUAAA	100,00
bta-miR-1249	ACGCCCUUCCCCCUUCUUA	hsa-miR-1249-3p	ACGCCCUUCCCCCUUCUUA	100,00
bta-miR-1260b	AUCCACCACUGCCACCA	hsa-miR-1260b	AUCCACCACUGCCACCAU	94,74
bta-miR-1271	CUUGGCACCUAGUAAGUACUCA	hsa-miR-1271-5p	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA	90,91
bta-miR-1277	UACGUAGAUAUAUGUAUUUU	hsa-miR-1277-3p	UACGUAGAUAUAUGUAUUUU	100,00
bta-miR-1281	UCGCCUCCUCUCUCC	hsa-miR-1281	UCGCCUCCUCUCUCC	100,00
bta-miR-1282	UCGUUUGCCUUUUUCUGCUU	hsa-miR-1282	UCGUUUGCCUUUUUCUGCUU	100,00
bta-miR-1284	UCUGCACAGACCCUGGCUUUUC	hsa-miR-1284	UCUAUACAGACCCUGGCUUUUC	90,91
bta-miR-1287	UGCUGGAUCAGUGGUUUGAGUC	hsa-miR-1287-5p	UGCUGGAUCAGUGGUUUGAGUC	95,45
bta-miR-1291	UGGCCUGACUGAAGACCAGCAGU	hsa-miR-1291	UGGCCUGACUGAAGACCAGCAGU	95,83
bta-miR-1296	UUAGGGCCUGGCUCCAUCUCC	hsa-miR-1296-5p	UUAGGGCCUGGCUCCAUCUCC	100,00
bta-miR-1298	UUCAUUCGGCUGUCCAGAUGUA	hsa-miR-1298-5p	UUCAUUCGGCUGUCCAGAUGUA	100,00
bta-miR-1301	UUGCAGCUGCCUAGGAGUGAUUUC	hsa-miR-1301-3p	UUGCAGCUGCCUGGAGUGACUUC	91,66
bta-miR-1306	CCACCUCCCCUGCAAACGUCC	hsa-miR-1306-5p	CCACCUCCCCUGCAAACGUCCA	95,45
bta-miR-1307	ACUCGGCGUGGCGUGGUGGUG	hsa-miR-1307-3p	ACUCGGCGUGGCGUGGUGGUG	100,00
bta-miR-1343-3p	CUCCUGGGGCCCGCACUCUC	hsa-miR-1343-3p	CUCCUGGGGCCCGCACUCUCG	90,91
bta-miR-1343-5p	UGGGGAGCGGCCCCGGGCGGG	hsa-miR-1343-5p	UGGGGAGCGGCCCCGGGUGGG	95,45
bta-miR-1388-3p	AUCUCAGGUUUGUCAGCCCGCA	Não encontrado	Não encontrado	
RNU43 snoRNA	CUUAUUGACGGGCGGACAGAAAC	RNU43 snoRNA	CUUAUUGACGGGCGGACAGAAAC	100,00
Hm/Ms/Rt U1 snRNA	CGACUGCAUAAUUUGUGGUAGUGG	Hm/Ms/Rt U1 snRNA	CGACUGCAUAAUUUGUGGUAGUGG	100,00

APÊNDICE H- Sequência dos primers fowards utilizados nos embriões no estudo 4.

miRNA	Sequência do primer
bta-let-7a-3p	CTATACAATCTACTGTCTTTC
bta-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
bta-let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
bta-let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
bta-let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
bta-let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT
bta-let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
bta-let-7g	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT
bta-let-7i	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
bta-miR-1	TGGAATGTAAGAAGTATGTAT
bta-miR-100	AACCCGTAGATCCGAACCTGTG
bta-miR-101	TACAGTACTGTGATAACTGAA
bta-miR-103	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
bta-miR-105a	TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT
bta-miR-105b	TCAAATGCTCAGACTCCTTGGT
bta-miR-106a	AAAAGTGCTACAGTGCAGGTA
bta-miR-106b	TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT
bta-miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATC
bta-miR-10a	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG
bta-miR-10b	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG
bta-miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTGTTG
bta-miR-124a	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG
bta-miR-124b	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG
bta-miR-125a	TCCCTGAGACCCCTTAACCTGTG
bta-miR-125b	TCCCTGAGACCCCTAAGTTGTGA
bta-miR-126-3p	CGTACCGTGAGTAATAATGCG
bta-miR-126-5p	CATTATTACTTTTGGTACGCG
bta-miR-127	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT
bta-miR-128	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT
bta-miR-129	CTTTTGCAGGTCTGGGCTTGCT
bta-miR-129-3p	AAGCCCTTACCCCAAAAAGCAT
bta-miR-129-5p	CTTTTGCAGGTCTGGGCTTGCT
bta-miR-130a	CAGTGCAATGTTAAAAGGGCAT
bta-miR-130b	CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT
bta-miR-132	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG
bta-miR-133a	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG
bta-miR-133b	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA
bta-miR-133c	ATTTGGTTCCATTTTACCAGC
bta-miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGTGG
bta-miR-135a	TATGGCTTTTATTCTATGTGA
bta-miR-135b	TATGGCTTTTATTCTATGTGA

bta-miR-136	ACTCCATTGTTTTGATGATGGA
bta-miR-137	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG
bta-miR-138	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG
bta-miR-139	TCTACAGTGACGTGTCTCCAGT
bta-miR-140	TACCACAGGGTAGAACCACGGA
bta-miR-141	TAACACTGTCTGGTAAAGATGG
bta-miR-142-3p	AGTGTTTCCTACTTTATGGATG
bta-miR-142-5p	CATAAAGTAGAAAGCACTAC
bta-miR-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCTCG
bta-miR-144	TACAGTATAGATGATGTACTAG
bta-miR-145	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT
bta-miR-146a	TGAGAACTGAATTCCATAGGTTGT
bta-miR-146b	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTGT
bta-miR-147	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA
bta-miR-148a	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT
bta-miR-148b	TCAGTGCATCACAGAACTTTGT
bta-miR-149-3p	GAGGGAGGGACGGGGGCTGTGC
bta-miR-149-5p	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC
bta-miR-150	TCTCCCAACCCTTGTAACAGTGT
bta-miR-151-3p	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG
bta-miR-151-5p	TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT
bta-miR-152	TCAGTGCATGACAGAACTTGGG
bta-miR-153	TTGCATAGTCACAAAAGTGATC
bta-miR-154a	TAGGTTATCCGTGTAGCCTTCG
bta-miR-154b	AGAGGTCTTCCATGGTGCATTCTG
bta-miR-154c	AGATATTGCACGGTTGATCTCT
bta-miR-155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT
bta-miR-15a	TAGCAGCACATAATGGTTTGT
bta-miR-15b	TAGCAGCACATCATGGTTTACA
bta-miR-16a	TAGCAGCACGTAATATTGGTG
bta-miR-16b	TAGCAGCACGTAATATTGGC
bta-miR-17-3p	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT
bta-miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT
bta-miR-181a	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTT
bta-miR-181b	AACATTCACTGCTGTCGGTGGGTT
bta-miR-181c	AACATTCAACCTGTCGGTGAGTTT
bta-miR-181d	AACATTCACTGTTGTCGGTGGGT
bta-miR-182	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT
bta-miR-183	TATGGCACTGGTAGAATTCAGTG
bta-miR-184	TGGACGGAGAACTGATAAGGGT
bta-miR-185	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA
bta-miR-186	CAAAGAATTCTCCTTTGGGCT
bta-miR-187	TCGTGTCTTGTTGCAGCCGG

bta-miR-188	CATCCCTTGCATGGTGGAGGGT
bta-miR-18a	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATA
bta-miR-18b	TAAGGTGCATCTAGTGCAGTTA
bta-miR-190a	TGATATGTTTGATATATTAGGT
bta-miR-190b	TGATATGTTTGATATTGGGTT
bta-miR-191	CAACGGAATCCCAAAAGCAGCTG
bta-miR-192	CTGACCTATGAATTGACAGCCAG
bta-miR-193a	GGGACTTTGTAGGCCAGTT
bta-miR-193a-3p	AACTGGCCTACAAAGTCCCAGT
bta-miR-193a-5p	TGGGTCTTTCGGGGCGAGATGA
bta-miR-193b	AACTGGCCACAAAGTCCCCTTT
bta-miR-194	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA
bta-miR-195	TAGCAGCACAGAAATATTGGCA
bta-miR-196a	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG
bta-miR-196b	TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGGA
bta-miR-197	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC
bta-miR-199a-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA
bta-miR-199a-5p	CCCAGTGTTTCAGACTACCTGTT
bta-miR-199b	CCCAGTGTTTAGACTATCTGTTC
bta-miR-199c	TACAGTAGTCTGCACATTGG
bta-miR-19a	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA
bta-miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAACTGA
bta-miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGTT
bta-miR-200b	TAATACTGCCTGGTAATGATG
bta-miR-200c	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA
bta-miR-202	TTCCTATGCATATACTTCTTT
bta-miR-204	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT
bta-miR-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG
bta-miR-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG
bta-miR-208a	ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT
bta-miR-208b	ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT
bta-miR-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG
bta-miR-20b	CAAAGTGCTCACAGTGCAGGTA
bta-miR-21-3p	AACAGCAGTCGATGGGCTGTCT
bta-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGACT
bta-miR-210	ACTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA
bta-miR-211	TTCCCTTTGTCATCCTTTGCC
bta-miR-212	ACCTTGGCTCTAGACTGCTTACT
bta-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT
bta-miR-215	ATGACCTATGAATTGACAGACA
bta-miR-216a	TAATCTCAGCTGGCAACTGTGA
bta-miR-216b	AAATCTCTGCAGGCAAATGTGA
bta-miR-217	TACTGCATCAGGAACTGATTGGAT

bta-miR-218	TTGTGCTTGATCTAACCATGTG
bta-miR-219	AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG
bta-miR-219-3p	AGAATTGTGGCTGGACATCTG
bta-miR-219-5p	TGATTGTCCAAACGCAATTCTT
bta-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTG
bta-miR-22-5p	AGTTCTTCAGTGGCAAGCTTTA
bta-miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT
bta-miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGT
bta-miR-223	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA
bta-miR-224	CAAGTCACTAGTGGTCCGTTTA
bta-miR-23a	ATCACATTGCCAGGGATTCCA
bta-miR-23b-3p	ATCACATTGCCAGGGATTACCAC
bta-miR-23b-5p	GGGTTCTGGCATGCTGATTT
bta-miR-24	GTGCCTACTGAGCTGATATCAGT
bta-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG
bta-miR-25	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
bta-miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
bta-miR-26b	TTCAAGTAATCAGGATAGGTT
bta-miR-26c	AGCCTATCCTGGATTACTTGAA
bta-miR-27a-3p	TTACAGTGGCTAAGTTCCG
bta-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCA
bta-miR-27b	TTACAGTGGCTAAGTTCTGC
bta-miR-28	AAGGAGCTCACAGTCTATTGAG
bta-miR-296-3p	GAGGGTTGGGCGGAGGCTTTCC
bta-miR-296-5p	GAGGGCCCCCCCCAATCCT
bta-miR-299	TGTTTTACCGTCCCACATACAT
bta-miR-29a	CTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
bta-miR-29b	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT
bta-miR-29c	TAGCACCATTGAAATCGGTTA
bta-miR-29d-3p	TAGCACCATTGAAATCGATTA
bta-miR-29d-5p	TGACCGATTTCTCCTGGTGTT
bta-miR-29e	TAGCATCATTGAAATCAGTGTTT
bta-miR-301a	CAGTGCAATAGTATTGTCAAAGCAT
bta-miR-301b	CAGTGCAATGATATTGTCAAAGCAT
bta-miR-302a	AAGTGCTTCCATGTTTTAGTGA
bta-miR-302b	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGTAG
bta-miR-302c	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG
bta-miR-302d	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGT
bta-miR-3064	TTGCCCACTGCAACACCTTACA
bta-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT
bta-miR-30b-3p	CTGGGAGGTGGATGTTTACTT
bta-miR-30b-5p	TGTAAACATCCTACACTCAGCT
bta-miR-30c	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC

bta-miR-30d	TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT
bta-miR-30e-5p	TGTAAACATCCTTGACTGGAAGCT
bta-miR-30f	TGTAAACACCCTACACTCTCAGCT
bta-miR-31	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT
bta-miR-32	TATTGCACATGACTAAGTTGCAT
bta-miR-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA
bta-miR-320b	AGCTGGGTTGAGAGGGTGGT
bta-miR-323	GCACATTACACGGTCGACCTCT
bta-miR-324	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT
bta-miR-326	CCTCTGGGCCCTTCCTCCAG
bta-miR-328	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCGT
bta-miR-329a	AACACACCTGGTTAACCTTTT
bta-miR-329b	AGAGGTTTTCTGGGTTTCTGTT
bta-miR-330	GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGA
bta-miR-331-3p	GCCCCTGGGCCTATCCTAGAA
bta-miR-331-5p	TCTAGGTATGGTCCCAGG
bta-miR-335	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT
bta-miR-338	TCCAGCATCAGTGATTTTGTGA
bta-miR-339a	TCCCTGTCTCCAGGAGCTCAC
bta-miR-339b	TCCCTGTCTCCAGGAGCTC
bta-miR-33a	GTGCATTGTAGTTGCATTGCA
bta-miR-33b	GTGCATTGCTGTTGCATTGC
bta-miR-340	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGCC
bta-miR-342	TCTCACACAGAAATCGCACCCATCT
bta-miR-345-3p	CCTGAAGTGGGGTCTGGAG
bta-miR-345-5p	GCTGACTCCTAGTCCAGTGCT
bta-miR-346	TGTCTGCCC GCATGCCTGCCTCT
bta-miR-34a	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
bta-miR-34b	AGGCAGTGTAATTAGCTGATTG
bta-miR-34c	AGGCAGTGTAATTAGCTGATTG
bta-miR-361	TTATCAGAATCTCCAGGGGTAC
bta-miR-362-3p	AACACACCTATTCAAGGATTC
bta-miR-362-5p	AATCCTTGGAACCTAGGTGTGAGT
bta-miR-363	ATTGCACGGTATCCATCTGCG
bta-miR-365-3p	TAATGCCCTAAAAATCCTTAT
bta-miR-365-5p	AGGGACTTTTGGGGGCAGATGTG
bta-miR-367	GAATTGCACTTTAGCAATGGTGA
bta-miR-369-3p	AATAATACATGGTTGATCTTT
bta-miR-369-5p	ATCGACCGTGTTATATTCGC
bta-miR-370	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT
bta-miR-371	AAGTGCCGCCATGTTTTGAGTGT
bta-miR-374a	TTATAATAACAACCTGATAAGTG
bta-miR-374b	ATATAATAACAACCTGCTAAGTG

bta-miR-375	TTTTGTTTCGTTCTGGCTCGCGTGA
bta-miR-376a	ATCATAGAGGAAAAATCCACGT
bta-miR-376b	ATCATAGAGGAAAAATCCATGTT
bta-miR-376c	GTGGATATTCCTTCTATGTTTA
bta-miR-376d	ATCATAGAGGAAAAATCCACAT
bta-miR-376e	AACATAGAGGAAAAATCCACATT
bta-miR-377	ATCACACAAAGGCAACTTTTGT
bta-miR-378	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-378b	ACTTGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-378c	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGT
bta-miR-378d	CTGGACTTGGAGTCAGAAGACC
bta-miR-379	TGGTAGACTATGGAACGTAGG
bta-miR-380-3p	TATGTAATGTGGTCCACGTCT
bta-miR-380-5p	TGGTTGACCATAGAACATGCGC
bta-miR-381	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
bta-miR-382	GAAGTTGTTCTGGTGGATTCTG
bta-miR-383	AGATCAGAAGGTGATTGTGGCT
bta-miR-409a	AGGTTACCCGAGCAACTTTGCAT
bta-miR-409b	GGGGTTTACCGAGCAACATTC
bta-miR-410	AATATAACACAGATGGCCTGT
bta-miR-411a	ATAGTAGACCGTATAGCGTACG
bta-miR-411b	TGGTCGACCATAAAACGTACGT
bta-miR-411c-3p	TGTATGTCAACTGATCCACAGT
bta-miR-411c-5p	GGTTGATCAGAGAACATACATT
bta-miR-412	ACTTCACCTGGTCCACTAGCTGT
bta-miR-421	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC
bta-miR-423-3p	AAGCTCGGTCTGAGGCCCTCAGT
bta-miR-423-5p	TGAGGGGAGAGAGCGAGACTTT
bta-miR-424-3p	CAAAACGTGAGGCGCTGCTAT
bta-miR-424-5p	CAGCAGCAATTCATGTTTTGA
bta-miR-425-3p	ATCGGGAATGTCGTGCCGCC
bta-miR-425-5p	ATGACACGATCACTCCCGTTGA
bta-miR-429	TAATACTGTCTGGTAATGCCGT
bta-miR-431	TGTCTTGACAGGCCGTCATGCAGG
bta-miR-432	TCTTGGAGTAGGTCATTGGGTGG
bta-miR-433	ATCATGATGGGCTCCTCGGTGT
bta-miR-448	TTGCATATGTAGGATGTCCCAT
bta-miR-449a	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT
bta-miR-449b	AGGCAGTGTATTGTTAGCTGGC
bta-miR-449c	AGGCAGTGCATCTCTAGCTGG
bta-miR-449d	GAAGGCTGTGTGCTGTGGAG
bta-miR-450a	TTTTGCGATGTGTTCTAATAT
bta-miR-450b	TTTTGCAATATGTTCTCTGAATA

bta-miR-451	AAACCGTTACCATTACTGAGTTT
bta-miR-452	TGTTTGCAGAGGAACTGAGAC
bta-miR-4523	GACCGAGAGGGCCTCGGCTGT
bta-miR-453	AGGTTGTCCGTGGTGAGTTCGCA
bta-miR-454	TAGTGCAATATTGCTTATAGGGT
bta-miR-455-3p	GCAGTCCATGGGCATATACACT
bta-miR-455-5p	TATGTGCCTTTGGACTACATC
bta-miR-483	TCACTCCTCTCCTCCCGTCTT
bta-miR-484	TCAGGCTCAGTCCCTCCCGAT
bta-miR-485	AGAGGCTGGCCGTGATGAATTCG
bta-miR-486	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAG
bta-miR-487a	AATCATACAGGGACATCCAGT
bta-miR-487b	AATCGTACAGGGTCATCCACTT
bta-miR-488	TTGAAAGGCTGTTTCTTGCTC
bta-miR-489	GTGACATCACATATATGGCGAC
bta-miR-490	CAACCTGGAGGACTCCATGCTG
bta-miR-491	AGTGGGGAACCCCTCCATGAGG
bta-miR-493	TGAAGGTCTACTGTGTGCCAGG
bta-miR-494	TGAAACATACACGGGAAACCTC
bta-miR-495	AAACAAACATGGTGCACTTCTT
bta-miR-496	TGAGTATTACATGGCCAATCTC
bta-miR-497	CAGCAGCAGCTGTGGTTTGTA
bta-miR-499	TTAAGACTTGCAGTGATGTTT
bta-miR-500	TAATCCTTGCTACCTGGGTGAGA
bta-miR-502a	AATGCACCTGGGCAAGGATTCA
bta-miR-502b	AATCCACCTGGGCAAGGATTC
bta-miR-503-3p	GGAGTATTGTTTCTGCTGCCCGG
bta-miR-503-5p	TAGCAGCGGGAACAGTACTG
bta-miR-504	AGACCCTGGTCTGCACTCTGTC
bta-miR-505	CGTCAACACTTGCTGGTTTCCT
bta-miR-532	CATGCCCTTGAGTGTAGGACCGT
bta-miR-539	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGT
bta-miR-541	TGGTGGGCACAGAATCCGGCCT
bta-miR-542-3p	TCGGGGATCATCATGTACAGAG
bta-miR-543	AAACATTGCGGGTGCACTTCTT
bta-miR-544a	ATTCTGCATTTTtagCAAGTTC
bta-miR-544b	ATTCTGCATTTCTAACAAGTTC
bta-miR-545-3p	ATCAACAAACATTTATTGTGTG
bta-miR-545-5p	TCAGTAAATGTTTATTGGATG
bta-miR-551a	GCGACCCAATCTTGGTTTCCA
bta-miR-551b	GGCGACCCATACTTGGTTTCAG
bta-miR-562	AAAGCAGCTGTACCATTAC
bta-miR-568	ATGTATAAATGTATACACAC

bta-miR-574	TGAGTGTGTGTGTGTGAGTGTGTG
bta-miR-582	TTACAGTTGTTCAACCAGTTACT
bta-miR-584	TGGTTTGCCTGGGACTGAG
bta-miR-592	ATTGTGTCAATATGCGATGATGT
bta-miR-599	GTTGTGTCAGTTTATCAAAC
bta-miR-615	GGGGGTCCCCGGTGCTCGGATC
bta-miR-628	ATGCTGACATATTTACTAGAGG
bta-miR-631	AGACCTGGCTTAGACCTCAGC
bta-miR-652	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG
bta-miR-653	GTGTTGAAACAATCTCTGTTG
bta-miR-654	TATGTCTGCTGACCATCACCTT
bta-miR-655	ATAATACATGGTTAACCTCTCT
bta-miR-656	AATATTATACAGTCAACCTCT
bta-miR-658	GGCGGAGGGAAGCGGGTCCGTTGGT
bta-miR-660	TACCCATTGCATATCGGAGCTG
bta-miR-664a	CAGGCTGGGGTGTGTGTGGATG
bta-miR-664b	TATTCATTATCTCCCAGCCTAC
bta-miR-665	ACCAGTAGGCCGAGGCCCT
bta-miR-669	TGTGGGTGTGTGCATGTGCGTG
bta-miR-670	TCCCTGAGTATATGTGGTGAA
bta-miR-671	AGGAAGCCCTGGAGGGGCTGGAG
bta-miR-677	CTCACTGATGAGCAGCTTCTGAC
bta-miR-7	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTT
bta-miR-708	AAGGAGCTTACAATCTAGCTGGG
bta-miR-744	TGCGGGGCTAGGGCTAACAGCA
bta-miR-758	TTTGTGACCTGGTCCACTAACC
bta-miR-759	GCAGACTGCAAACAATTTTGAC
bta-miR-760-3p	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGA
bta-miR-760-5p	CCCCTCAGTCCACCAGAGCCCG
bta-miR-761	GCAGCAGGGTGAACTGACACA
bta-miR-763	CCAGCTGGGAGGAACCAAGTGGC
bta-miR-764	GGTGCTCACTCGTCCTTCT
bta-miR-767	TGCACCATGGTTGTCTGAGCATG
bta-miR-769	TGAGACCTCCGGGTCTGAGCT
bta-miR-873	GCAGGAACTGTGAGTCTCCT
bta-miR-874	CTGCCCTGGCCCCGAGGGACCGA
bta-miR-875	TATACCTCAGTTTTATCAGGTG
bta-miR-876	TGGATTCTTTGTGAATCACCA
bta-miR-877	GTAGAGGAGATGGCGCAGGG
bta-miR-885	TCCATTACACTACCCTGCCTCT
bta-miR-9-3p	ATAAAGCTAGATAACCG
bta-miR-9-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG
bta-miR-92a	TATTGCACTTGCCCGCCTGT

bta-miR-92b	TATTGCACTCGTCCCGGCTCC
bta-miR-93	CAAAGTGCTGTTCTGTCAGGTA
bta-miR-935	CCAGTTACCGCTTCCGCTACCGC
bta-miR-940	AAGGCTGGGCCCCCGCTCCGC
bta-miR-95	TTCAACGGGTATTTATTGAGCA
bta-miR-96	TTTGGACTIONGACATTTTTGCT
bta-miR-98	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
bta-miR-99a-3p	CAAGCTCGTTCTATGGGT
bta-miR-99a-5p	AACCCGTAGATCCGATCTTGT
bta-miR-99b	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG
bta-miR-1179	AAGCATTCTTTCATTGGTTGG
bta-miR-1185	AGAGGATACCCCTTTGTATGTT
bta-miR-1193	TAGGTCACCCGTTTGACTATC
bta-miR-1197	TAGGACACATGGTCTACTTCT
bta-miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG
bta-miR-1224	GTGAGGACTCGGGAGGTGGAG
bta-miR-1225-3p	CCGAGCCCCTGTGCCGCCCCAG
bta-miR-1246	AATGGATTTTGGAGCAGG
bta-miR-1247-3p	CGGGAACGTCGGGACTGGAGC
bta-miR-1247-5p	ACCCGTCCCGTGCGTCCCGGA
bta-miR-1248	ACCTTCTTGATAAGCACTGTGCTAAA
bta-miR-1249	ACGCCCTTCCCCCTTCTTCA
bta-miR-1260b	ATCCCACCACTGCCACCA
bta-miR-1271	CTTGGCACCTAGTAAGTACTCA
bta-miR-1277	TACGTAGATATATGTATTTT
bta-miR-1281	TCGCCTCCTCCTCTCCC
bta-miR-1282	TCGTTTGCTTTTCTGCTT
bta-miR-1284	TCTGCACAGACCCTGGCTTTTC
bta-miR-1287	TGCTGGATCAGTGGTTTGAGTC
bta-miR-1291	TGGCCCTGACTGAAGACCTGCAGT
bta-miR-1296	TTAGGGCCCTGGCTCCATCTCC
bta-miR-1298	TTCATTCGCTGTCCAGATGTA
bta-miR-1301	TTGCAGCTGCCTAGGAGTGATTTC
bta-miR-1306	CCACCTCCCCTGCAAACGTCC
bta-miR-1307	ACTCGGCGTGGCGTCGGTCGTG
bta-miR-1343-3p	CTCCTGGGGCCCCGCACTCTC
bta-miR-1343-5p	TGGGGAGCGGCCCCGGGCGGG
bta-miR-1388-3p	ATCTCAGGTTTGTGAGCCCGCA
RNT43 snoRNA	CTTATTGACGGGCGGACAGAAAC
Hm/Ms/Rt T1 snRNA	CGACTGCATAATTTGTGGTAGTGG
bta-miR-99b	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG

APÊNDICE I- Expressão relativa dos miRNAs relacionados com metabolismo e estresse celular nos oócitos e células do cumulus provenientes de COC imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. Os dados mostram as médias $\pm$ desvio padrão

GENES	Oócitos			Células do cumulus		
	Imaturo	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	Imaturo	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
<i>SREBP1</i>	0.281 $\pm$ 0.067	0.368 $\pm$ 0.167	0.319 $\pm$ 0.201	0.109 $\pm$ 0.021	0.071 $\pm$ 0.009	0.142 $\pm$ 0.025
<i>ACACA</i>	0.137 $\pm$ 0.011	0.119 $\pm$ 0.014	0.130 $\pm$ 0.016	0.008 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.001	0.023 $\pm$ 0.005
<i>FASN</i>	0.127 $\pm$ 0.021	0.131 $\pm$ 0.021	0.107 $\pm$ 0.021	0.109 $\pm$ 0.039	0.054 $\pm$ 0.004	0.090 $\pm$ 0.030
<i>PLIN2</i>	2.294 $\pm$ 0.687	2.031 $\pm$ 0.697	2.763 $\pm$ 0.788	0.332 $\pm$ 0.246	1.118 $\pm$ 0.361	2.025 $\pm$ 0.336
<i>PLIN3</i>	0.086 $\pm$ 0.004	0.100 $\pm$ 0.068	0.141 $\pm$ 0.102	0.024 $\pm$ 0.008	0.022 $\pm$ 0.007	0.022 $\pm$ 0.004
<i>SCD</i>	0.040 $\pm$ 0.017	0.032 $\pm$ 0.004	0.042 $\pm$ 0.003	0.292 $\pm$ 0.026	0.443 $\pm$ 0.071	0.623 $\pm$ 0.126
<i>FADS2</i>	0.002 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.002	0.015 $\pm$ 0.005	0.015 $\pm$ 0.005	0.027 $\pm$ 0.011
<i>ACSL3</i>	0.344 $\pm$ 0.034	0.336 $\pm$ 0.071	0.392 $\pm$ 0.088	0.007 $\pm$ 0.004	0.018 $\pm$ 0.003	0.016 $\pm$ 0.004
<i>ACSL6</i>	0.048 $\pm$ 0.009	0.051 $\pm$ 0.009	0.046 $\pm$ 0.011	0.007 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.004	0.016 $\pm$ 0.003
<i>ELOVL6</i>	0.003 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.001	0.003 $\pm$ 0.001	0.014 $\pm$ 0.002	0.010 $\pm$ 0.001	0.0131 $\pm$ 0.003
<i>CPT1a</i>	0.149 $\pm$ 0.019	0.267 $\pm$ 0.114	0.214 $\pm$ 0.093	0.005 $\pm$ 0.002	0.078 $\pm$ 0.034	0.050 $\pm$ 0.014
<i>CPT1b</i>	0.016 $\pm$ 0.014	0.019 $\pm$ 0.011	0.027 $\pm$ 0.012	0.001 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.001	0.003 $\pm$ 0.001
<i>CPT2</i>	0.162 $\pm$ 0.071	0.183 $\pm$ 0.147	0.189 $\pm$ 0.080	0.009 $\pm$ 0.003	0.017 $\pm$ 0.004	0.016 $\pm$ 0.003
<i>G6PD</i>	0.189 $\pm$ 0.042	0.238 $\pm$ 0.017	0.235 $\pm$ 0.029	0.082 $\pm$ 0.018	0.128 $\pm$ 0.019	0.170 $\pm$ 0.026
<i>PFKP</i>	0.012 $\pm$ 0.003	0.013 $\pm$ 0.005	0.008 $\pm$ 0.004	0.068 $\pm$ 0.010	0.060 $\pm$ 0.006	0.098 $\pm$ 0.019
<i>PGK1</i>	0.031 $\pm$ 0.003	0.026 $\pm$ 0.001	0.023 $\pm$ 0.004	0.120 $\pm$ 0.020	0.162 $\pm$ 0.020	0.222 $\pm$ 0.019
<i>IRE1</i>	4.891 $\pm$ 1.222	8.679 $\pm$ 4.996	6.449 $\pm$ 2.899	0.032 $\pm$ 0.008	0.030 $\pm$ 0.008	0.035 $\pm$ 0.006
<i>ATF6</i>	0.362 $\pm$ 0.062	0.516 $\pm$ 0.282	0.578 $\pm$ 0.440	0.089 $\pm$ 0.018	0.656 $\pm$ 0.075	0.693 $\pm$ 0.095
<i>PERK</i>	0.304 $\pm$ 0.145	0.341 $\pm$ 0.102	0.399 $\pm$ 0.126	0.067 $\pm$ 0.031	0.048 $\pm$ 0.007	0.049 $\pm$ 0.008
<i>ATF4</i>	0.385 $\pm$ 0.046	0.406 $\pm$ 0.055	0.499 $\pm$ 0.010	0.250 $\pm$ 0.105	0.293 $\pm$ 0.046	0.300 $\pm$ 0.035
<i>CHOP10</i>	2.564 $\pm$ 0.591	2.951 $\pm$ 1.130	3.278 $\pm$ 1.332	0.086 $\pm$ 0.041	0.038 $\pm$ 0.006	0.036 $\pm$ 0.010
<i>BAX</i>	0.139 $\pm$ 0.021	0.135 $\pm$ 0.024	0.145 $\pm$ 0.029	0.022 $\pm$ 0.003	0.043 $\pm$ 0.004	0.064 $\pm$ 0.016
<i>BCL2</i>	0.003 $\pm$ 0.002	0.003 $\pm$ 0.002	0.005 $\pm$ 0.001	4.0E-05 $\pm$ 3.6E-05	0.034 $\pm$ 0.006	0.063 $\pm$ 0.020
<i>GRP78</i>	0.298 $\pm$ 0.104	0.260 $\pm$ 0.051	0.228 $\pm$ 0.078	2.304 $\pm$ 0.982	0.393 $\pm$ 0.076	0.886 $\pm$ 0.167
<i>CASP3</i>	0.028 $\pm$ 0.002	0.023 $\pm$ 0.006	0.029 $\pm$ 0.009	0.005 $\pm$ 0.002	0.006 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.002
<i>CASP9</i>	0.044 $\pm$ 0.010	0.056 $\pm$ 0.015	0.056 $\pm$ 0.006	0.007 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.002	0.022 $\pm$ 0.006
<i>NRF2</i>	0.022 $\pm$ 0.009	0.025 $\pm$ 0.002	0.032 $\pm$ 0.004	0.008 $\pm$ 0.002	0.025 $\pm$ 0.005	0.018 $\pm$ 0.001
<i>KEAP1</i>	0.082 $\pm$ 0.015	0.080 $\pm$ 0.022	0.080 $\pm$ 0.016	0.024 $\pm$ 0.005	0.043 $\pm$ 0.003	0.049 $\pm$ 0.016
<i>SOD1</i>	0.753 $\pm$ 0.110	0.788 $\pm$ 0.028	0.775 $\pm$ 0.123	0.109 $\pm$ 0.024	0.135 $\pm$ 0.010	0.196 $\pm$ 0.035
<i>SOD2</i>	0.253 $\pm$ 0.061	0.150 $\pm$ 0.080	0.177 $\pm$ 0.072	0.013 $\pm$ 0.006	0.013 $\pm$ 0.012	0.026 $\pm$ 0.014
<i>GPX1</i>	0.125 $\pm$ 0.019	0.083 $\pm$ 0.020	0.089 $\pm$ 0.017	0.926 $\pm$ 0.117	1.067 $\pm$ 0.105	0.937 $\pm$ 0.095
<i>GPX4</i>	0.401 $\pm$ 0.062	0.466 $\pm$ 0.089	0.526 $\pm$ 0.056	0.211 $\pm$ 0.061	0.121 $\pm$ 0.019	0.113 $\pm$ 0.018
<i>PRDX1</i>	1.460 $\pm$ 0.535	2.194 $\pm$ 0.360	1.861 $\pm$ 0.183	0.169 $\pm$ 0.021	0.679 $\pm$ 0.128	0.207 $\pm$ 0.035
<i>CAT</i>	0.143 $\pm$ 0.017	0.160 $\pm$ 0.016	0.182 $\pm$ 0.032	0.036 $\pm$ 0.008	0.045 $\pm$ 0.003	0.051 $\pm$ 0.007

APÊNDICE J. Fotomicrografias confocais suplementares de 6 COCs imaturos. Para cada oócito; à esquerda a imagem dos canais em sobreposição obtida na objetiva 63 x. As três imagens do centro foram obtidas na objetiva de 63 x. Começando de cima para baixo: marcação do núcleo (azul), imunomarcação da FABP3 com Alexa Fluor 488 (verde) e marcação da TZPs (actina) utilizando-se Alexa Fluor 647 faloidina (vermelha). A maior imagem representa o zoom digital dos canais em sobreposição.

Immature COCs

APÊNDICE K- Fotomicrografias confocais suplementares de 9 COCs após 9 horas de MIV. Para cada oócito; à esquerda a imagem dos canais em sobreposição obtida na objetiva 63 x. As três imagens do centro foram obtidas na objetiva de 63 x. Começando de acima para abaixo: marcação do núcleo (azul), imunomarcação da FABP3 com Alexa Fluor 488 (verde) e marcação da TZPs (actina) utilizando-se Alexa Fluor 647 (vermelha). A maior imagem representa o zoom digital dos canais em sobreposição.

COCs matured for 9 hours

APÊNDICE L- Fotomicrografias confocais suplementares de 9 oócitos desnudos (DO) após 9 horas de MIV. Para cada oócito; à esquerda a imagem dos canais em sobreposição obtida na objetiva 63 x. As três imagens do centro foram obtidas na objetiva de 63 x. Começando de acima para abaixo: marcação do núcleo (azul), imunomarcação da FABP3 com Alexa Fluor 488 (verde) e marcação da TZPs (actina) utilizando-se Alexa Fluor 647 faloidina (vermelha). A maior imagem representa o zoom digital dos canais em sobreposição.

Denuded oocytes matured for 9 hours

APÊNDICE M- Fotomicrografias confocais suplementares de 9 oócitos parcialmente desnudos (PDO) após 9 horas de MIV. Para cada oócito; à esquerda a imagem dos canais em sobreposição obtida na objetiva 63 x. As três imagens do centro foram obtidas na objetiva de 63 x. Começando de acima para abaixo: marcação do núcleo (azul), imunomarcação da FABP3 com Alexa Fluor 488 (verde) e marcação da TZPs (actina) utilizando-se Alexa Fluor 647 faloidina (vermelha). A maior imagem representa o zoom digital dos canais em sobreposição.

Partially denuded oocytes matured for 9 hours

APÊNDICE N- Fotomicrografias confocais suplementares de 9 oócitos após 18 horas de MIV. Para cada oócito; à esquerda a imagem dos canais em sobreposição obtida na objetiva 63 x. As três imagens do centro foram obtidas na objetiva de 63 x. Começando de acima para abaixo: marcação do núcleo (azul), imunomarcação da FABP3 com Alexa Fluor 488 (verde) e marcação da TZPs (actina) utilizando-se Alexa Fluor 647 faloidina (vermelha). A maior imagem representa o zoom digital dos canais em sobreposição.

COCs matured for 18 hours

APÊNDICE O- Fotomicrografia confocal do controle negativo da FABP3 sem o anticorpo primario. Nao detectou-se sinal da imunomarcacão da FABP utilizando Alexa Fluor 488 (verde). As TZPs (actinas) foram marcadas com Alexa Fluor 647 faloidina (vermelho); os núcleos com DAPI (Azul). As imagens foram tomadas numa objetiva de 63X. O quadrado representa o zoom digital de 3,5x.

FABP3 immunodetection negative control

APÊNDICE P- Fotomicrografias confocais suplementares de 6 COCs cultivados *in vitro* por 9 horas na ausência de citocalasina B. Para cada oócito; à esquerda a imagem dos canais em sobreposição obtida na objetiva 63 x. As três imagens do centro foram obtidas na objetiva de 63 x. Começando de acima para abaixo: marcação do núcleo (azul), imunomarcação da FABP3 com Alexa Fluor 488 (verde) e marcação da TZPs (actina) utilizando-se Alexa Fluor 647 faloidina (vermelha). A maior imagem representa o zoom digital dos canais em sobreposição.

COCs matured for 9 hours in the absence of cytochalasin B (control)

APÊNDICE Q- Fotomicrografias confocais suplementares de 6 COCs cultivados *in vitro* por 9 horas na presença de citocalasina B. Para cada oócito; à esquerda a imagem dos canais em sobreposição obtida na objetiva 63 x. As três imagens do centro foram obtidas na objetiva de 63 x. Começando de acima para abaixo: marcação do núcleo (azul), imunomarcação da FABP3 com Alexa Fluor 488 (verde) e marcação da TZPs (actina) utilizando-se Alexa Fluor 647 faloidina (vermelha). A maior imagem representa o zoom digital dos canais em sobreposição.

COCs matured for 9 hours in the presence of cytochalasin B

APÊNDICE R- Expressão relativa dos miRNAs nos oócitos e células do cumulus provenientes de COC imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. Os dados mostram as médias $\pm$ desvio padrão

miRNAs	Ócitos						Células do cumulus							
	Imaturo		In vitro		In vivo		Imaturo		In vitro		In vivo			
bta-let-7a-3p	0,0003	± 0,0002	±		±		bta-let-7a-3p	0,0011	±	0,0004	0,0006	± 0,0003	0,0006	± 0,0002
bta-let-7b	0,0107	± 0,0059	0,0072	± 0,0039	0,0072	± 0,0039	bta-let-7b	0,0614	±	0,0157	0,0441	± 0,0130	0,0684	± 0,0053
bta-let-7c	0,0155	± 0,0077	0,0075	± 0,0024	0,0065	± 0,0030	bta-let-7c	0,1226	±	0,0313	0,0739	± 0,0064	0,0691	± 0,0117
bta-let-7d	0,0048	± 0,0017	0,0032	± 0,0006	0,0021	± 0,0012	bta-let-7d	0,0456	±	0,0069	0,0329	± 0,0005	0,0189	± 0,0034
bta-let-7e	0,0218	± 0,0088	0,0189	± 0,0046	0,0134	± 0,0011	bta-let-7e	0,1382	±	0,0156	0,1244	± 0,0062	0,0853	± 0,0102
bta-let-7f	0,0079	± 0,0037	0,0057	± 0,0014	0,0021	± 0,0013	bta-let-7f	0,0289	±	0,0084	0,0313	± 0,0014	0,0292	± 0,0010
bta-let-7g	0,0043	± 0,0025	0,0013	± 0,0003	0,0015	± 0,0013	bta-let-7g	0,0157	±	0,0037	0,0159	± 0,0034	0,0175	± 0,0064
bta-let-7i	0,0047	± 0,0019	0,0054	± 0,0033	0,0028	± 0,0008	bta-let-7i	0,0197	±	0,0031	0,0264	± 0,0074	0,0342	± 0,0117
bta-miR-1		±	0,0004	± 0,0004		±	bta-miR-100	0,0107	±	0,0010	0,0093	± 0,0007	0,0126	± 0,0007
bta-miR-100	0,0029	± 0,0016	0,0015	± 0,0003	0,0009	± 0,0002	bta-miR-101	0,0013	±	0,0008	0,0015	± 0,0002	0,0011	± 0,0003
bta-miR-101	0,0019	± 0,0011	0,0012	± 0,0008	0,0009	± 0,0003	bta-miR-103	0,0064	±	0,0009	0,0093	± 0,0011	0,0097	± 0,0029
bta-miR-103	0,0049	± 0,0020	0,0045	± 0,0009	0,0024	± 0,0005	bta-miR-105a	0,0003	±	0,0001		±	0,0000	± 0,0000
bta-miR-105a	0,0026	± 0,0010	0,0030	± 0,0009	0,0022	± 0,0007	bta-miR-105b	0,0008	±	0,0002	0,0011	± 0,0005	0,0002	± 0,0001
bta-miR-105b	0,0029	± 0,0007	0,0022	± 0,0006	0,0015	± 0,0003	bta-miR-107	0,0009	±	0,0003	0,0002	± 0,0001	0,0005	± 0,0000
bta-miR-107	0,0003	± 0,0000	0,0001	± 0,0001	0,0002	± 0,0001	bta-miR-10a	0,0029	±	0,0001	0,0019	± 0,0007	0,0016	± 0,0004
bta-miR-10a	0,0245	± 0,0103	0,0221	± 0,0039	0,0165	± 0,0021	bta-miR-10b	0,0031	±	0,0003	0,0020	± 0,0006	0,0018	± 0,0001
bta-miR-10b	0,0239	± 0,0095	0,0170	± 0,0045	0,0187	± 0,0066	bta-miR-122	0,0014	±	0,0012		±	0,0001	± 0,0001
bta-miR-122	0,0034	± 0,0024	0,0012	± 0,0001	0,0011	± 0,0005	bta-miR-126-3p	0,0000	±	0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0002	± 0,0000
bta-miR-126-3p	0,0002	± 0,0001	0,0006	± 0,0005		±	bta-miR-126-5p		±			±	0,0002	± 0,0000
bta-miR-126-5p	0,0008	± 0,0002		±		±	bta-miR-127	0,0115	±	0,0016	0,0161	± 0,0079	0,0040	± 0,0004
bta-miR-127	0,0131	± 0,0108	0,0078	± 0,0053	0,0058	± 0,0050	bta-miR-128	0,0011	±	0,0001	0,0004	± 0,0002	0,0011	± 0,0002
bta-miR-128	0,0008	± 0,0003	0,0004	± 0,0002	0,0010	± 0,0003	bta-miR-129	0,0027	±	0,0009	0,0018	± 0,0000	0,0012	± 0,0010
bta-miR-129	0,0074	± 0,0002		±	0,0060	± 0,0021	bta-miR-129-3p		±		0,0002	± 0,0001	0,0006	± 0,0003
bta-miR-129-3p	0,0008	± 0,0008	0,0003	± 0,0000	0,0002	± 0,0001	bta-miR-129-5p	0,0026	±	0,0008	0,0013	± 0,0008	0,0011	± 0,0002
bta-miR-129-5p	0,0079	± 0,0033	0,0049	± 0,0023	0,0036	± 0,0002	bta-miR-130a	0,0030	±	0,0012	0,0015	± 0,0010	0,0024	± 0,0007
bta-miR-130a	0,0015	± 0,0011	0,0016	± 0,0006	0,0010	± 0,0003	bta-miR-130b	0,0243	±	0,0065	0,0256	± 0,0036	0,0071	± 0,0011
bta-miR-130b	0,0056	± 0,0023	0,0038	± 0,0001	0,0027	± 0,0014	bta-miR-133a	0,0013	±	0,0002	0,0009	± 0,0003		±
bta-miR-133a	0,0050	± 0,0032	0,0104	± 0,0023	0,0051	± 0,0014	bta-miR-133b		±			±	0,0000	± 0,0000
bta-miR-133b	0,0003	± 0,0000	0,0004	± 0,0001		±	bta-miR-133c	0,0001	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-134	0,0022	± 0,0020	0,0060	± 0,0064	0,0019	± 0,0014	bta-miR-134	0,0006	±	0,0001	0,0007	± 0,0001	0,0004	± 0,0004
bta-miR-135a	0,0004	± 0,0002	0,0005	± 0,0003	0,0004	± 0,0004	bta-miR-135a	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0001
bta-miR-135b	0,0001	± 0,0001		±	0,0002	± 0,0000	bta-miR-135b	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-138	0,0228	± 0,0167	0,0343	± 0,0026	0,0175	± 0,0042	bta-miR-138	0,0110	±	0,0005	0,0071	± 0,0011	0,0031	± 0,0022
bta-miR-139	0,0048	± 0,0057	0,0030	± 0,0009	0,0018	± 0,0006	bta-miR-139	0,0004	±	0,0001	0,0003	± 0,0000	0,0001	± 0,0001
bta-miR-140	0,0007	± 0,0003	0,0003	± 0,0002	0,0007	± 0,0004	bta-miR-140	0,0013	±	0,0006	0,0012	± 0,0003	0,0016	± 0,0007
bta-miR-141	0,0051	± 0,0020	0,0050	± 0,0024	0,0058	± 0,0055	bta-miR-141	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0001	0,0003	± 0,0001
bta-miR-145	0,0074	± 0,0059		±		±	bta-miR-147	0,0002	±	0,0000	0,0001	± 0,0001		±
bta-miR-147	0,0012	± 0,0013	0,0021	± 0,0012	0,0012	± 0,0006	bta-miR-148a	0,0056	±	0,0021	0,0039	± 0,0006	0,0055	± 0,0015

bta-miR-148a	0,0462	± 0,0106	0,0402	± 0,0081	0,0311	± 0,0222	bta-miR-148b	0,0052	±	0,0021	0,0029	± 0,0013	0,0050	± 0,0016
bta-miR-148b	0,0261	± 0,0097	0,0178	± 0,0072	0,0108	± 0,0041	bta-miR-150		±			± 0,0001	± 0,0000	
bta-miR-150	0,0003	± 0,0002		±	0,0002	± 0,0001	bta-miR-151-3p	0,0057	±	0,0005	0,0040	± 0,0000	0,0039	± 0,0001
bta-miR-151-3p	0,0071	± 0,0035	0,0062	± 0,0036	0,0054	± 0,0025	bta-miR-151-5p	0,0110	±	0,0021	0,0095	± 0,0030	0,0097	± 0,0020
bta-miR-151-5p	0,0350	± 0,0306	0,0142	± 0,0020	0,0155	± 0,0056	bta-miR-152	0,0010	±	0,0014		± 0,0011	± 0,0008	
bta-miR-152	0,0006	± 0,0004		±	0,0005	± 0,0002	bta-miR-154a	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0001
bta-miR-154a	0,0004	± 0,0002	0,0003	± 0,0001		±	bta-miR-154b		±		0,0002	± 0,0001	0,0004	± 0,0004
bta-miR-154b	0,0010	± 0,0007	0,0032	± 0,0038	0,0005	± 0,0005	bta-miR-155	0,0007	±	0,0003	0,0688	± 0,0313	0,0341	± 0,0068
bta-miR-155	0,0011	± 0,0011	0,0204	± 0,0112	0,0015	± 0,0001	bta-miR-17-3p	0,0007	±	0,0002	0,0006	± 0,0001	0,0004	± 0,0002
bta-miR-17-3p	0,0012	± 0,0009	0,0007	± 0,0004	0,0004	± 0,0001	bta-miR-183		±		0,0003	± 0,0001	0,0016	± 0,0001
bta-miR-183		±	0,0005	± 0,0001		±	bta-miR-184	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-184	0,0002	± 0,0001	0,0005	± 0,0006	0,0002	± 0,0002	bta-miR-185	0,0009	±	0,0002	0,0013	± 0,0006	0,0010	± 0,0005
bta-miR-185	0,0008	± 0,0003	0,0012	± 0,0010	0,0004	± 0,0002	bta-miR-187	0,0056	±	0,0036	0,0026	± 0,0026	0,0012	± 0,0006
bta-miR-187	0,0144	± 0,0089	0,0078	± 0,0044	0,0068	± 0,0024	bta-miR-188	0,0019	±	0,0006	0,0010	± 0,0004	0,0008	± 0,0001
bta-miR-188	0,0030	± 0,0026	0,0035	± 0,0022	0,0026	± 0,0011	bta-miR-18a	0,0016	±	0,0005	0,0026	± 0,0004	0,0027	± 0,0012
bta-miR-18a	0,0035	± 0,0016	0,0059	± 0,0015	0,0049	± 0,0038	bta-miR-18b	0,0007	±	0,0003	0,0015	± 0,0002	0,0008	± 0,0005
bta-miR-18b	0,0017	± 0,0009	0,0014	± 0,0004	0,0008	± 0,0010	bta-miR-190a	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-190a	0,0002	± 0,0001	0,0001	± 0,0000		±	bta-miR-190b	0,0002	±	0,0000	0,0002	± 0,0000	0,0002	± 0,0001
bta-miR-191	0,0045	± 0,0011	0,0030	± 0,0022	0,0026	± 0,0003	bta-miR-191	0,0089	±	0,0009	0,0074	± 0,0018	0,0060	± 0,0006
bta-miR-192	0,0018	± 0,0015	0,0006	± 0,0004		±	bta-miR-192	0,0017	±	0,0001	0,0008	± 0,0004	0,0003	± 0,0001
bta-miR-193a	0,0001	± 0,0001	0,0003	± 0,0002	0,0002	± 0,0002	bta-miR-193a-3p	0,0010	±	0,0004		±	0,0012	± 0,0006
bta-miR-193a-3p	0,0006	± 0,0004		±	0,0006	± 0,0003	bta-miR-193a-5p	0,0066	±	0,0033	0,0020	± 0,0004	0,0017	± 0,0000
bta-miR-193a-5p	0,0170	± 0,0127	0,0023	± 0,0017	0,0054	± 0,0029	bta-miR-193b	0,0013	±	0,0001	0,0004	± 0,0002	0,0002	± 0,0000
bta-miR-193b	0,0005	± 0,0004	0,0005	± 0,0001		±	bta-miR-194	0,0009	±	0,0004	0,0010	± 0,0003	0,0013	± 0,0005
bta-miR-194	0,0015	± 0,0008	0,0010	± 0,0001	0,0018	± 0,0020	bta-miR-196a	0,0002	±	0,0001	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0001
bta-miR-196a	0,0016	± 0,0021	0,0004	± 0,0001		±	bta-miR-196b	0,0002	±	0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0001
bta-miR-196b		±	0,0001	± 0,0001		±	bta-miR-197	0,0772	±	0,0221	0,0167	± 0,0066	0,0141	± 0,0021
bta-miR-197	0,0100	± 0,0028		±	0,0100	± 0,0006	bta-miR-199b	0,0002	±	0,0001	0,0001	± 0,0000		±
bta-miR-199c	0,0010	± 0,0010	0,0005	± 0,0002	0,0005	± 0,0005	bta-miR-19a	0,0039	±	0,0036	0,0015	± 0,0005	0,0018	± 0,0003
bta-miR-19a	0,0062	± 0,0053	0,0054	± 0,0042	0,0053	± 0,0048	bta-miR-19b	0,0040	±	0,0033	0,0018	± 0,0002	0,0015	± 0,0005
bta-miR-19b	0,0055	± 0,0047	0,0055	± 0,0044	0,0029	± 0,0022	bta-miR-200a	0,0001	±	0,0001	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0000
bta-miR-200a		±		±	0,0008	± 0,0010	bta-miR-205	0,0004	±	0,0001		±	0,0003	± 0,0002
bta-miR-205	0,0097	± 0,0017	0,0089	± 0,0020	0,0074	± 0,0039	bta-miR-208a	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-208a	0,0001	± 0,0000		±		±	bta-miR-208b	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-21-3p		±	0,0031	± 0,0016	0,0019	± 0,0020	bta-miR-21-5p	0,0017	±	0,0007	0,0205	± 0,0059	0,0160	± 0,0044
bta-miR-21-5p	0,0013	± 0,0005	0,0048	± 0,0012	0,0018	± 0,0006	bta-miR-210	0,0327	±	0,0096	0,0239	± 0,0123	0,0306	± 0,0069
bta-miR-210	0,0185	± 0,0010		±	0,0083	± 0,0023	bta-miR-214	0,0037	±	0,0010	0,0032	± 0,0014	0,0018	± 0,0003
bta-miR-212	0,0002	± 0,0000		±		±	bta-miR-215	0,0002	±	0,0001	0,0001	± 0,0001	0,0004	± 0,0001
bta-miR-214	0,0150	± 0,0166	0,0082	± 0,0041	0,0073	± 0,0037	bta-miR-216b	0,0001	±	0,0000		±	0,0000	± 0,0000
bta-miR-215	0,0002	± 0,0000	0,0003	± 0,0002		±	bta-miR-217	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-216a	0,0065	± 0,0005	0,0063	± 0,0019	0,0065	± 0,0008	bta-miR-219-3p	0,0014	±	0,0005	0,0011	± 0,0011		±
bta-miR-216b	0,0001	± 0,0000		±		±	bta-miR-219-5p	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-219	0,0115	± 0,0087	0,0227	± 0,0257	0,0059	± 0,0003	bta-miR-22-3p		±			±	71489,3095	± 44464,1805

bta-miR-219-3p	0,0029	± 0,0012	±	±	1003328	946786,	bta-miR-22-5p	±	0,0004	± 0,0001	0,0011	± 0,0003	
bta-miR-22-3p		±	±		,9180	± 1306	bta-miR-221	0,0075	± 0,0022	0,0185	± 0,0131	0,0045	± 0,0021
bta-miR-22-5p	0,0158	± 0,0152	0,0016	± 0,0011	0,0011	± 0,0011	bta-miR-222	0,0082	± 0,0010	0,0128	± 0,0041	0,0107	± 0,0094
bta-miR-221	0,0041	± 0,0032	0,0046	± 0,0036	0,0020	± 0,0008	bta-miR-224	0,0015	± 0,0004	0,0008	± 0,0001	0,0016	± 0,0004
bta-miR-222	0,0169	± 0,0141	0,0168	± 0,0103	0,0080	± 0,0055	bta-miR-23b-5p	0,0004	± 0,0002	0,0003	± 0,0001	0,0001	± 0,0000
bta-miR-23b-5p		± 0,0004	± 0,0001		0,0007	± 0,0007	bta-miR-24	0,0001	± 0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-24		± 0,0001	± 0,0001			±	bta-miR-26c	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000		±
bta-miR-27a-5p	0,0006	± 0,0002	0,0013	± 0,0014	0,0004	± 0,0002	bta-miR-27a-5p	0,0005	± 0,0003	0,0006	± 0,0001	0,0010	± 0,0001
bta-miR-27b	0,0126	± 0,0020	0,0169	± 0,0083	0,0137	± 0,0106	bta-miR-27b	0,0092	± 0,0017	0,0024	± 0,0006	0,0042	± 0,0007
bta-miR-296-3p	0,0181	± 0,0079	0,0171	± 0,0096	0,0162	± 0,0107	bta-miR-28	0,0005	± 0,0000	0,0008	± 0,0002	0,0011	± 0,0003
bta-miR-296-5p	0,0098	± 0,0078	0,0260	± 0,0278	0,0131	± 0,0099	bta-miR-296-3p	0,0083	± 0,0010	0,0058	± 0,0015	0,0023	± 0,0001
bta-miR-29a	0,0037	± 0,0025	0,0047	± 0,0012	0,0028	± 0,0021	bta-miR-296-5p	0,0039	± 0,0013	0,0349	± 0,0449	0,0038	± 0,0028
bta-miR-29d-5p	0,0002	± 0,0001	0,0004	± 0,0000	0,0026	± 0,0031	bta-miR-299	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000		±
bta-miR-29e	0,0003	± 0,0001	0,0008	± 0,0004	0,0003	± 0,0001	bta-miR-29a	0,0153	± 0,0047	0,0264	± 0,0087	0,0380	± 0,0131
bta-miR-301a	0,0006	± 0,0005	0,0008	± 0,0008		±	bta-miR-29d-5p	0,0001	± 0,0000	0,0004	± 0,0001	0,0003	± 0,0000
bta-miR-301b	0,0004	± 0,0001	0,0002	± 0,0000	0,0003	± 0,0000	bta-miR-29e	0,0014	± 0,0008	0,0008	± 0,0001	0,0011	± 0,0005
bta-miR-302a		± 0,0005	± 0,0001		0,0002	± 0,0000	bta-miR-301a	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-30b-3p	0,0003	± 0,0001	0,0006	± 0,0003	0,0005	± 0,0005	bta-miR-301b	0,0001	± 0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0001	± 0,0000
bta-miR-30e-5p	0,0070	± 0,0027	0,0054	± 0,0007	0,0051	± 0,0020	bta-miR-302a	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-30f	0,0023	± 0,0012	0,0021	± 0,0007	0,0017	± 0,0012	bta-miR-30b-3p	0,0002	± 0,0000	0,0003	± 0,0001	0,0004	± 0,0002
bta-miR-31	0,0153	± 0,0094	0,0139	± 0,0024	0,0086	± 0,0034	bta-miR-30e-5p	0,0116	± 0,0018	0,0100	± 0,0025	0,0144	± 0,0051
bta-miR-320a	0,2217	± 0,1791	0,0172	± 0,0002	0,0436	± 0,0037	bta-miR-30f	0,0049	± 0,0008		± 0,0044	± 0,0022	
bta-miR-320b		± 0,0044	± 0,0012		0,0050	± 0,0008	bta-miR-31	0,0509	± 0,0154	0,0382	± 0,0097	0,0463	± 0,0248
bta-miR-323	3,1976	± 0,1119	3,7878	± 0,9390	4,8329	± 2,6449	bta-miR-320a	0,0519	± 0,0285	0,0473	± 0,0107	0,0482	± 0,0064
bta-miR-324	0,0017	± 0,0008	0,0015	± 0,0005	0,0024	± 0,0006	bta-miR-320b	0,0033	± 0,0009	0,0020	± 0,0018	0,0012	± 0,0005
bta-miR-326	0,0190	± 0,0007	0,0230	± 0,0066	0,0169	± 0,0089	bta-miR-323	0,1862	± 0,0853	0,1448	± 0,0087	0,1110	± 0,0439
bta-miR-328	0,0047	± 0,0003	0,0038	± 0,0027	0,0457	± 0,0574	bta-miR-324	0,0011	± 0,0003	0,0009	± 0,0001	0,0008	± 0,0001
bta-miR-329a	0,0003	± 0,0002	0,0004	± 0,0004	0,0003	± 0,0004	bta-miR-326	0,0044	± 0,0018	0,0034	± 0,0015	0,0016	± 0,0006
bta-miR-329b	0,0001	± 0,0001	0,0003	± 0,0000		±	bta-miR-328	0,0026	± 0,0002	0,0028	± 0,0021	0,0029	± 0,0014
bta-miR-331-5p	0,0013	± 0,0000	0,0016	± 0,0010	0,0017	± 0,0005	bta-miR-329a	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-335	0,0009	± 0,0005	0,0009	± 0,0004	0,0006	± 0,0006	bta-miR-329b	0,0001	± 0,0001	0,0000	± 0,0001	0,0000	± 0,0000
bta-miR-338	0,0069	± 0,0002	0,0054	± 0,0014	0,0076	± 0,0054	bta-miR-331-3p	0,0005	± 0,0001	0,0005	± 0,0004	0,0010	± 0,0002
bta-miR-339a	0,0077	± 0,0035	0,0082	± 0,0028	0,0090	± 0,0025	bta-miR-335	0,0006	± 0,0005	0,0004	± 0,0002	0,0002	± 0,0001
bta-miR-339b	0,0090	± 0,0018	0,0095	± 0,0031		±	bta-miR-338	0,0003	± 0,0001	0,0002	± 0,0001	0,0001	± 0,0001
bta-miR-342	0,0011	± 0,0002			0,0014	± 0,0000	bta-miR-339a	0,0099	± 0,0031	0,0061	± 0,0047	0,0039	± 0,0029
bta-miR-345-3p	0,0030	± 0,0010	0,0034	± 0,0018	0,0035	± 0,0009	bta-miR-339b	0,0135	± 0,0069	0,0115	± 0,0079	0,0080	± 0,0018
bta-miR-345-5p	0,0016	± 0,0009			0,0014	± 0,0001	bta-miR-340	0,0001	± 0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0001	± 0,0000
bta-miR-361	0,0033	± 0,0016	0,0065	± 0,0069	0,0016	± 0,0009	bta-miR-342	0,0024	± 0,0006	0,0003	± 0,0001	0,0008	± 0,0002
bta-miR-362-3p	0,0008	± 0,0005	0,0017	± 0,0013	0,0006	± 0,0005	bta-miR-345-3p	0,0018	± 0,0011	0,0011	± 0,0009		±
bta-miR-362-5p	0,0005	± 0,0001	0,0006	± 0,0004	0,0004	± 0,0000	bta-miR-345-5p	0,0004	± 0,0002		±		±
bta-miR-363	0,0012	± 0,0002	0,0026	± 0,0026	0,0010	± 0,0001	bta-miR-361	0,0028	± 0,0003	0,0012	± 0,0006	0,0008	± 0,0003
bta-miR-365-5p	0,0029	± 0,0018	0,0050	± 0,0027	0,0023	± 0,0012	bta-miR-362-3p	0,0011	± 0,0005	0,0008	± 0,0005	0,0011	± 0,0007
bta-miR-370	0,0191	± 0,0146	0,0155	± 0,0115	0,0077	± 0,0019	bta-miR-362-5p	0,0013	± 0,0003	0,0006	± 0,0005	0,0007	± 0,0002

bta-miR-371	0,0003	± 0,0001	0,0003	± 0,0001	0,0003	± 0,0000	bta-miR-363	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-375	0,0008	± 0,0006	0,0036	± 0,0041	0,0019	± 0,0014	bta-miR-365-5p	0,0020	±	0,0009	0,0012	± 0,0006	0,0008	± 0,0003
bta-miR-376a		±		±	0,0002	± 0,0001	bta-miR-367	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000		±
bta-miR-377	0,0002	± 0,0001	0,0001	± 0,0000	0,0002	± 0,0000	bta-miR-369-3p		±		0,0000	± 0,0000		±
bta-miR-378b	0,0012	± 0,0004		±	0,0006	± 0,0004	bta-miR-369-5p	0,0000	±	0,0000		±		±
bta-miR-378c	0,0002	± 0,0001	0,0016	± 0,0020	0,0004	± 0,0005	bta-miR-370	0,0066	±	0,0021	0,0057	± 0,0040	0,0039	± 0,0008
bta-miR-379	0,0003	± 0,0002	0,0005	± 0,0003		±	bta-miR-371	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0000
bta-miR-380-3p		±	0,0006	± 0,0006	0,0004	± 0,0002	bta-miR-375	0,0005	±	0,0000	0,0008	± 0,0003	0,0003	± 0,0001
bta-miR-380-5p	0,0021	± 0,0022	0,0016	± 0,0014	0,0062	± 0,0084	bta-miR-376a	0,0004	±	0,0003	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0001
bta-miR-382	0,0139	± 0,0179	0,0207	± 0,0346	0,0220	± 0,0372	bta-miR-376b	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-383	0,0038	± 0,0050	0,0028	± 0,0022	0,0023	± 0,0008	bta-miR-376c		±			±	0,0000	± 0,0000
bta-miR-409a	0,0004	± 0,0004	0,0004	± 0,0003		±	bta-miR-376d	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000		±
bta-miR-409b	0,0004	± 0,0004	0,0004	± 0,0003		±	bta-miR-376e	0,0000	±	0,0000		±	0,0000	± 0,0000
bta-miR-410	0,0007	± 0,0001	0,0010	± 0,0007	0,0004	± 0,0002	bta-miR-377	0,0000	±	0,0000		±		±
bta-miR-411a	0,0004	± 0,0001	0,0001	± 0,0001		±	bta-miR-378b	0,0018	±	0,0005	0,0007	± 0,0005	0,0009	± 0,0005
bta-miR-411b	0,0022	± 0,0037	0,0002	± 0,0001	0,0004	± 0,0001	bta-miR-378c	0,0006	±	0,0002	0,0012	± 0,0006	0,0005	± 0,0003
bta-miR-411c-3p	0,0001	± 0,0001	0,0001	± 0,0001		±	bta-miR-379	0,0006	±	0,0000	0,0007	± 0,0005	0,0004	± 0,0004
bta-miR-412	0,0002	± 0,0001	0,0003	± 0,0002		±	bta-miR-380-3p	0,0002	±	0,0001	0,0003	± 0,0002	0,0001	± 0,0001
bta-miR-423-3p	0,0052	± 0,0048		±	0,0042	± 0,0027	bta-miR-380-5p	0,0004	±	0,0001	0,0002	± 0,0001	0,0003	± 0,0002
bta-miR-423-5p	0,0069	± 0,0063	0,0024	± 0,0010	0,0010	± 0,0005	bta-miR-382	0,0003	±	0,0001	0,0008	± 0,0010	0,0014	± 0,0020
bta-miR-424-3p	0,0024	± 0,0005	0,0058	± 0,0060	0,0043	± 0,0039	bta-miR-383	0,0010	±	0,0002	0,0006	± 0,0003		±
bta-miR-425-3p	0,0489	± 0,0018	0,2291	± 0,2581		±	bta-miR-409a	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-425-5p	0,0013	± 0,0001	0,0019	± 0,0011	0,0009	± 0,0007	bta-miR-410		±		0,0001	± 0,0001		±
bta-miR-431	0,0049	± 0,0030	0,0027	± 0,0008	0,0032	± 0,0006	bta-miR-411a	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0001	± 0,0000
bta-miR-432	0,0030	± 0,0006	0,0041	± 0,0042	0,0019	± 0,0012	bta-miR-411b	0,0001	±	0,0001	0,0003	± 0,0003	0,0001	± 0,0000
bta-miR-433		±	0,0049	± 0,0041	0,0023	± 0,0006	bta-miR-411c-5p	0,0002	±	0,0000	0,0001	± 0,0001	0,0000	± 0,0000
bta-miR-449b	0,0009	± 0,0008	0,0008	± 0,0007	0,0008	± 0,0003	bta-miR-412	0,0063	±	0,0031	0,0032	± 0,0027	0,0054	± 0,0008
bta-miR-449c	0,0046	± 0,0049	0,0021	± 0,0018	0,0015	± 0,0007	bta-miR-423-3p	0,0062	±	0,0005	0,0039	± 0,0027	0,0068	± 0,0008
bta-miR-449d	0,0045	± 0,0002		±	0,0052	± 0,0035	bta-miR-423-5p		±			±	0,0004	± 0,0001
bta-miR-451	0,0005	± 0,0001	0,0004	± 0,0002	0,0042	± 0,0021	bta-miR-424-3p	0,0204	±	0,0011	0,0354	± 0,0103	0,0216	± 0,0089
bta-miR-453	0,0046	± 0,0031	0,0216	± 0,0352	0,0047	± 0,0059	bta-miR-425-3p	0,0038	±	0,0004	0,0033	± 0,0027	0,0037	± 0,0002
bta-miR-454	0,0002	± 0,0000		±		±	bta-miR-425-5p		±		0,0012	± 0,0013	0,0005	± 0,0001
bta-miR-483	0,0005	± 0,0000		±		±	bta-miR-431	0,0004	±	0,0001	0,0004	± 0,0001		±
bta-miR-484	0,0007	± 0,0006	0,0012	± 0,0001	0,0004	± 0,0003	bta-miR-432		±		0,0009	± 0,0004		±
bta-miR-485		±	0,0003	± 0,0003	0,0002	± 0,0001	bta-miR-433	0,0005	±	0,0003	0,0003	± 0,0001	0,0002	± 0,0000
bta-miR-486	0,0207	± 0,0037	0,0291	± 0,0126	0,0212	± 0,0017	bta-miR-449b	0,0007	±	0,0001	0,0005	± 0,0000	0,0003	± 0,0002
bta-miR-487a	0,0003	± 0,0003	0,0005	± 0,0002		±	bta-miR-449c	0,0093	±	0,0029	0,0050	± 0,0053	0,0035	± 0,0004
bta-miR-487b	0,0004	± 0,0001		±	0,0002	± 0,0001	bta-miR-449d	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0001	0,0001	± 0,0001
bta-miR-488	0,0002	± 0,0000	0,0001	± 0,0002		±	bta-miR-450a	0,0001	±	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
bta-miR-489		±		±	0,0004	± 0,0001	bta-miR-450b	0,0000	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0185	± 0,0015
bta-miR-490	0,0034	± 0,0014	0,0056	± 0,0037	0,0043	± 0,0011	bta-miR-451	0,0001	±	0,0001	0,0002	± 0,0001	0,0002	± 0,0000
bta-miR-491	0,0001	± 0,0000		±	0,0001	± 0,0000	bta-miR-452	0,0004	±	0,0003	0,0003	± 0,0002	0,0001	± 0,0001
bta-miR-493	0,0074	± 0,0013	0,0094	± 0,0045	0,0072	± 0,0040	bta-miR-453		±		0,0001	± 0,0001	0,0003	± 0,0001

bta-miR-494	5,5601	± 2,4762	13,6950	± 6,1480	9,4399	± 3,8279	bta-miR-454	0,0001	±	0,0001	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-496		±		±	0,0005	± 0,0002	bta-miR-455-3p		±	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000	
bta-miR-500	0,0011	± 0,0002	0,0013	± 0,0001	0,0015	± 0,0006	bta-miR-455-5p	0,0001	±	0,0000		0,0002	± 0,0001	
bta-miR-502a	0,0003	± 0,0003	0,0004	± 0,0001		±	bta-miR-483		±	0,0017	± 0,0015	0,0038	± 0,0005	
bta-miR-502b	0,0008	± 0,0005	0,0009	± 0,0005	0,0006	± 0,0003	bta-miR-484	0,0016	±	0,0004			±	
bta-miR-503-3p	0,0593	± 0,0148	0,0621	± 0,0276	0,0519	± 0,0227	bta-miR-485	0,0001	±	0,0000		0,0098	± 0,0054	
bta-miR-504	0,0012	± 0,0009	0,0018	± 0,0010	0,0017	± 0,0009	bta-miR-486	0,0093	±	0,0014		0,0001	± 0,0000	
bta-miR-505	0,0057	± 0,0002	0,0029	± 0,0007	0,0032	± 0,0006	bta-miR-487a		±	0,0001	± 0,0001	0,0000	± 0,0000	
bta-miR-532	0,0023	± 0,0015	0,0020	± 0,0023	0,0017	± 0,0017	bta-miR-487b		±	0,0002	± 0,0001	0,0001	± 0,0000	
bta-miR-541	0,0249	± 0,0152	0,0121	± 0,0083	0,0154	± 0,0056	bta-miR-488	0,0001	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-542-5p		±	0,0001	± 0,0000	0,0004	± 0,0003	bta-miR-489		±	0,0008	± 0,0009		±	
bta-miR-544a	0,0003	± 0,0001	0,0002	± 0,0000		±	bta-miR-490	0,0016	±	0,0004	0,0006	± 0,0001	0,0006	± 0,0001
bta-miR-544b	0,0006	± 0,0007	0,0006	± 0,0002	0,0006	± 0,0004	bta-miR-491	0,0006	±	0,0000	0,0141 11,445	± 0,0165		±
bta-miR-545-3p	0,0002	± 0,0001		±		±	bta-miR-493		±	9	± 5,4540	19,5940	± 16,2987	
bta-miR-551a	0,0004	± 0,0003		±		±	bta-miR-494	6,4711	±	3,0403	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-551b	0,0003	± 0,0002		±		±	bta-miR-496	0,0001	±	0,0000	0,0028	± 0,0003	0,0027	± 0,0002
bta-miR-574	0,7254	± 0,3545	0,6916	± 0,2465	0,5916	± 0,2370	bta-miR-500	0,0033	±	0,0015	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0000
bta-miR-584	0,0154	± 0,0098	0,0133	± 0,0070	0,0063	± 0,0023	bta-miR-502a	0,0001	±	0,0001	0,0020	± 0,0002	0,0017	± 0,0002
bta-miR-592	0,0002 5371,984	± 0,0001 2785,9	0,0004 5901,83	± 0,0003 5561,548		± 7220,49	bta-miR-502b	0,0030	±	0,0010	0,0004	± 0,0003	0,0003	± 0,0000
bta-miR-615	5	± 191	92	± 7	99	± 59	bta-miR-504	0,0008	±	0,0003	0,0015	± 0,0003	0,0029	± 0,0005
bta-miR-631	2,6630	± 2,1622	1,7296	± 0,3950	2,0093	± 0,4978	bta-miR-505	0,0066	±	0,0018	0,0014	± 0,0002	0,0014	± 0,0003
bta-miR-652	0,0028	± 0,0006	0,0023	± 0,0003	0,0023	± 0,0004	bta-miR-532	0,0034	±	0,0023	0,0001	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-654	0,0043	± 0,0014	0,0041	± 0,0021	0,0039	± 0,0013	bta-miR-539	0,0000	±	0,0001	0,0041	± 0,0050	0,0015	± 0,0011
bta-miR-655		±		±	0,0003	± 0,0003	bta-miR-541	0,0054	±	0,0023		±	0,0002	± 0,0000
bta-miR-656	0,0005	± 0,0003	0,0006	± 0,0006	0,0008	± 0,0002	bta-miR-542-5p		±	0,0002	± 0,0001	0,0000	± 0,0000	
bta-miR-658	0,0010	± 0,0004	0,0020	± 0,0016	0,0017	± 0,0007	bta-miR-543	0,0001	±	0,0001		±	0,0000	± 0,0000
bta-miR-660	0,0032	± 0,0004	0,0025	± 0,0009	0,0024	± 0,0014	bta-miR-544a	0,0000	±	0,0000	0,0002	± 0,0001	0,0001	± 0,0000
bta-miR-664a	0,0099	± 0,0063	0,0176	± 0,0106	0,0111	± 0,0057	bta-miR-544b		±	0,0001	± 0,0000	0,0001	± 0,0001	
bta-miR-664b	0,0080	± 0,0001	0,0072	± 0,0014	0,0060	± 0,0019	bta-miR-545-3p	0,0001	±	0,0000	0,0001	± 0,0001	0,0001	± 0,0000
bta-miR-669	0,1026	± 0,0781	0,1073	± 0,0349	0,0926	± 0,0215	bta-miR-545-5p	0,0001	±	0,0000	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0001
bta-miR-677	0,0129	± 0,0044	0,0139	± 0,0058	0,0104	± 0,0028	bta-miR-551a		±	0,0001	± 0,0001	0,0000	± 0,0000	
bta-miR-7	0,0020	± 0,0010	0,0018	± 0,0008	0,0009	± 0,0001	bta-miR-551b	0,0001	±	0,0001	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-708		±	0,0004	± 0,0003	0,0007	± 0,0006	bta-miR-562	0,0001	±	0,0001	0,2454	± 0,0753	0,1724	± 0,0382
bta-miR-744		±	0,0012	± 0,0009	0,0007	± 0,0006	bta-miR-574	0,2729	±	0,0389	0,0027	± 0,0021		±
bta-miR-760-3p		±	0,0164	± 0,0140		±	bta-miR-584	0,0049	±	0,0031	0,0001	± 0,0001	0,0001	± 0,0000
bta-miR-760-5p	0,0560	± 0,0308	0,0349	± 0,0171	0,0420	± 0,0029	bta-miR-592		±		±			±
bta-miR-761	0,0006	± 0,0000		±		±	bta-miR-599	0,0000 155,90	±	0,0000 95,018	33	± 21	0	± 62,6908
bta-miR-763	0,0068	± 0,0051	0,0128	± 0,0091	0,0104	± 0,0012	bta-miR-615	09	±	8	0,0000	± 0,0000	0,0000	± 0,0000
bta-miR-767	0,0016	± 0,0010	0,0013	± 0,0005	0,0012	± 0,0001	bta-miR-628	0,0000	±	0,0000	0,2536	± 0,1526	0,0710	± 0,0100
bta-miR-769	0,0019	± 0,0007	0,0016	± 0,0007	0,0015	± 0,0006	bta-miR-631	0,1739	±	0,0615	0,0032	± 0,0007	0,0060	± 0,0023
bta-miR-874	0,0434	± 0,0379	0,0467	± 0,0343	0,0731	± 0,0202	bta-miR-652	0,0027	±	0,0005	0,0000	± 0,0000		±
bta-miR-876	0,0001	± 0,0001		±		±	bta-miR-653	0,0000	±	0,0000	0,0020	± 0,0011	0,0021	± 0,0019
bta-miR-877	0,0875	± 0,0740	0,0615	± 0,0701	0,0204	± 0,0060	bta-miR-654	0,0037	±	0,0012		±	0,0000	± 0,0000

bta-miR-885	0,0036	±	0,0019	0,0028	±	0,0037	0,0020	±	0,0014	bta-miR-655	0,0000	±	0,0000	0,0001	±	0,0000	0,0001	±	0,0000
bta-miR-9-5p	0,0082	±	0,0007	0,0060	±	0,0025	0,0037	±	0,0013	bta-miR-656	0,0001	±	0,0000	0,0013	±	0,0005	0,0006	±	0,0002
bta-miR-935		±		0,0133	±	0,0119		±		bta-miR-658	0,0006	±	0,0004	0,0028	±	0,0005	0,0030	±	0,0002
bta-miR-940	0,3080	±	0,1503	0,3229	±	0,1912	0,2420	±	0,0709	bta-miR-660	0,0034	±	0,0010	0,0205	±	0,0022	0,0142	±	0,0008
bta-miR-98	0,0005	±	0,0003	0,0003	±	0,0000	0,0004	±	0,0002	bta-miR-664b	0,0176	±	0,0014	0,0325	±	0,0145	0,0101	±	0,0045
bta-miR-99a-3p	0,0001	±	0,0001		±		0,0010	±	0,0010	bta-miR-665		±		0,1035	±	0,0275	0,0881	±	0,0205
bta-miR-99a-5p	0,0073	±	0,0023	0,0028	±	0,0003	0,0027	±	0,0016	bta-miR-677	0,1166	±	0,0369	0,0008	±	0,0002	0,0008	±	0,0003
										bta-miR-7	0,0007	±	0,0002	0,0031	±	0,0008	0,0016	±	0,0002
										bta-miR-708	0,0004	±	0,0001	0,0017	±	0,0008	0,0012	±	0,0003
										bta-miR-744		±		0,0001	±	0,0000	0,0000	±	0,0000
										bta-miR-758	0,0001	±	0,0001	0,0081	±	0,0089	0,0019	±	0,0008
										bta-miR-760-3p	0,0047	±	0,0019	0,0128	±	0,0052	0,0077	±	0,0034
										bta-miR-760-5p		±		0,0004	±	0,0001	0,0002	±	0,0000
										bta-miR-761	0,0005	±	0,0000	0,0031	±	0,0001	0,0016	±	0,0004
										bta-miR-763	0,0030	±	0,0017	0,0005	±	0,0001		±	
										bta-miR-764		±		0,0005	±	0,0001	0,0003	±	0,0002
										bta-miR-767	0,0004	±	0,0002	0,0005	±	0,0000	0,0004	±	0,0001
										bta-miR-769		±		0,0065	±	0,0022	0,0031	±	0,0001
										bta-miR-874	0,0052	±	0,0006	0,0002	±	0,0001	0,0003	±	0,0001
										bta-miR-876	0,0003	±	0,0001	0,0286	±	0,0096	0,0092	±	0,0028
										bta-miR-877	0,0317	±	0,0085		±			±	
										bta-miR-885	0,0006	±	0,0004	0,0003	±	0,0001	0,0002	±	0,0000
										bta-miR-9-5p	0,0002	±	0,0001		±			±	
										bta-miR-935	0,0199	±	0,0066	0,4381	±	0,3504	0,1148	±	0,0080
										bta-miR-940	0,2835	±	0,0789	0,0001	±	0,0000	0,0001	±	0,0000
										bta-miR-95	0,0001	±	0,0000	0,0020	±	0,0004	0,0015	±	0,0008
										bta-miR-98	0,0021	±	0,0003	0,0005	±	0,0001	0,0006	±	0,0002
										bta-miR-99a-3p	0,0005	±	0,0001	0,0163	±	0,0028	0,0188	±	0,0037

APÊNDICE S- Expressão relativa dos miRNAs blastocisto produzidos *in vivo* e *in vitro*.

Os dados mostram as médias $\pm$ desvio padrão

miRNAs	Blastocistos				
	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>		
bta-let-7a-3p	0,0011	$\pm$ 0,0001	0,0004	$\pm$ 0,0003	
bta-miR-103	0,0128	$\pm$ 0,0077	0,0141	$\pm$ 0,0030	
bta-let-7a-5p	0,0454	$\pm$ 0,0376	0,0149	$\pm$ 0,0225	
bta-miR-105a		$\pm$		$\pm$	
bta-let-7b	0,0446	$\pm$ 0,0269	0,0134	$\pm$ 0,0219	
bta-miR-105b	0,0010	$\pm$ 0,0005	0,0012	$\pm$ 0,0004	
bta-let-7c	0,0620	$\pm$ 0,0441	0,0202	$\pm$ 0,0322	
bta-miR-106a	0,0328	$\pm$ 0,0157	0,0438	$\pm$ 0,0115	
bta-let-7d	0,0196	$\pm$ 0,0130	0,0063	$\pm$ 0,0089	
bta-miR-106b	0,0135	$\pm$ 0,0095	0,0120	$\pm$ 0,0029	
bta-let-7e	0,0636	$\pm$ 0,0478	0,0199	$\pm$ 0,0302	
bta-miR-107	0,0009	$\pm$ 0,0007	0,0009	$\pm$ 0,0003	
bta-let-7f	0,0134	$\pm$ 0,0107	0,0048	$\pm$ 0,0073	
bta-miR-10a	0,0047	$\pm$ 0,0032	0,0029	$\pm$ 0,0021	
bta-let-7g	0,0107	$\pm$ 0,0093	0,0034	$\pm$ 0,0056	
bta-miR-10b	0,0050	$\pm$ 0,0036	0,0022	$\pm$ 0,0013	
bta-let-7i	0,0021	$\pm$ 0,0007	0,0014	$\pm$ 0,0014	
bta-miR-122	0,0010	$\pm$ 0,0011		$\pm$	
bta-miR-1		$\pm$		$\pm$	
bta-miR-124a	0,0006	$\pm$ 0,0004	0,0004	$\pm$ 0,0001	
bta-miR-100	0,0012	$\pm$ 0,0007	0,0005	$\pm$ 0,0004	
bta-miR-124b	0,0011	$\pm$ 0,0013	0,0005	$\pm$ 0,0004	
bta-miR-101	0,0059	$\pm$ 0,0045	0,0036	$\pm$ 0,0004	
bta-miR-125a	0,0081	$\pm$ 0,0066	0,0054	$\pm$ 0,0015	
bta-miR-125b	0,0167	$\pm$ 0,0104	0,0043	$\pm$ 0,0049	
bta-miR-133b		$\pm$	0,0002	$\pm$ 0,0000	
bta-miR-126-3p	0,0011	$\pm$ 0,0007	0,0011	$\pm$ 0,0003	
bta-miR-133c	0,0002	$\pm$ 0,0001		$\pm$	
bta-miR-126-5p	0,0001	$\pm$ 0,0001	0,0001	$\pm$ 0,0000	
bta-miR-134		$\pm$	0,0004	$\pm$ 0,0004	
bta-miR-127	0,0033	$\pm$ 0,0015	0,0041	$\pm$ 0,0011	
bta-miR-135a	0,0008	$\pm$ 0,0007		$\pm$	
bta-miR-128	0,0007	$\pm$ 0,0006	0,0005	$\pm$ 0,0004	
bta-miR-135b	0,0003	$\pm$ 0,0001	0,0002	$\pm$ 0,0001	
bta-miR-129	0,0008	$\pm$ 0,0004	0,0012	$\pm$ 0,0003	
bta-miR-136		$\pm$		$\pm$	
bta-miR-129-3p	0,0005	$\pm$ 0,0002	0,0004	$\pm$ 0,0001	
bta-miR-137		$\pm$		$\pm$	
bta-miR-129-5p	0,0007	$\pm$ 0,0003	0,0008	$\pm$ 0,0008	

bta-miR-138		±		0,0017	±	0,0013
bta-miR-130a	0,0014	±	0,0002	0,0014	±	0,0009
bta-miR-139	0,0008	±	0,0006	0,0006	±	0,0003
bta-miR-130b	0,0385	±	0,0212	0,0378	±	0,0140
bta-miR-140		±		0,0010	±	0,0010
bta-miR-132	0,0006	±	0,0002	0,0009	±	0,0005
bta-miR-141	0,0445	±	0,0347	0,0122	±	0,0139
bta-miR-133a	0,0002	±	0,0001		±	
bta-miR-142-3p	0,0004	±	0,0001		±	
bta-miR-142-5p	0,0006	±	0,0003		±	
bta-miR-151-3p	0,0042	±	0,0031	0,0045	±	0,0017
bta-miR-143	0,0027	±	0,0003	0,0028	±	0,0014
bta-miR-151-5p	0,0152	±	0,0081	0,0136	±	0,0019
bta-miR-144		±			±	
bta-miR-152		±			±	
bta-miR-145	0,0023	±	0,0012	0,0009	±	0,0009
bta-miR-153		±			±	
bta-miR-146a	0,0002	±	0,0001		±	
bta-miR-154a	0,0001	±	0,0000	0,0001	±	0,0000
bta-miR-146b		±			±	
bta-miR-154b	0,0021	±	0,0009	0,0024	±	0,0007
bta-miR-147	0,0005	±	0,0003	0,0003	±	0,0002
bta-miR-154c	0,0003	±	0,0002	0,0004	±	0,0001
bta-miR-148a	0,0161	±	0,0138	0,0095	±	0,0046
bta-miR-155	0,0003	±	0,0001	0,0009	±	0,0003
bta-miR-148b	0,0127	±	0,0096	0,0088	±	0,0040
bta-miR-15a	0,0097	±	0,0048	0,0062	±	0,0041
bta-miR-149-3p	0,0159	±	0,0116	0,0520	±	0,0291
bta-miR-15b	0,0081	±	0,0044	0,0089	±	0,0026
bta-miR-149-5p	0,0010	±	0,0006	0,0013	±	0,0010
bta-miR-16a	0,0173	±	0,0135	0,0141	±	0,0029
bta-miR-150	0,0005	±	0,0004		±	
bta-miR-16b	0,0311	±	0,0200	0,0292	±	0,0020
bta-miR-17-3p	0,0013	±	0,0001	0,0018	±	0,0007
bta-miR-188	0,0013	±	0,0003	0,0009	±	0,0007
bta-miR-17-5p	0,0060	±	0,0037	0,0067	±	0,0011
bta-miR-18a	0,0069	±	0,0048	0,0106	±	0,0035
bta-miR-181a	0,0009	±	0,0012	0,0004	±	0,0002
bta-miR-18b	0,0018	±	0,0019	0,0039	±	0,0008
bta-miR-181b	0,0007	±	0,0003	0,0003	±	0,0002
bta-miR-190a	0,0009	±	0,0005	0,0006	±	0,0004
bta-miR-181c	0,0004	±	0,0001	0,0001	±	0,0001
bta-miR-190b		±			±	

bta-miR-181d	0,0007	±	0,0005	0,0006	±	0,0005
bta-miR-191	0,0059	±	0,0033	0,0039	±	0,0009
bta-miR-182	0,0012	±	0,0008	0,0007	±	0,0001
bta-miR-192	0,0021	±	0,0021	0,0020	±	0,0009
bta-miR-183	0,0005	±	0,0002	0,0001	±	0,0000
bta-miR-193a		±			±	
bta-miR-184	0,0004	±	0,0003	0,0004	±	0,0001
bta-miR-193a-3p		±		0,0001	±	0,0001
bta-miR-185	0,0016	±	0,0013	0,0013	±	0,0007
bta-miR-193a-5p	0,0017	±	0,0009	0,0020	±	0,0015
bta-miR-186	0,0016	±	0,0013	0,0023	±	0,0013
bta-miR-193b	0,0001	±	0,0001	0,0004	±	0,0002
bta-miR-187	0,0014	±	0,0011	0,0020	±	0,0011
bta-miR-194	0,0064	±	0,0042	0,0060	±	0,0014
bta-miR-195	0,0045	±	0,0033	0,0048	±	0,0018
bta-miR-200c	0,0418	±	0,0287	0,0117	±	0,0144
bta-miR-196a	0,0005	±	0,0005	0,0011	±	0,0006
bta-miR-202		±		0,0007	±	0,0007
bta-miR-196b	0,0009	±	0,0008	0,0009	±	0,0004
bta-miR-204	0,0005	±	0,0001	0,0004	±	0,0003
bta-miR-197	0,0020	±	0,0006	0,0019	±	0,0014
bta-miR-205	0,0011	±	0,0004	0,0005	±	0,0002
bta-miR-199a-3p	0,0016	±	0,0005		±	
bta-miR-206	0,0005	±	0,0004	0,0004	±	0,0001
bta-miR-199a-5p	0,0008	±	0,0009	0,0005	±	0,0006
bta-miR-208a		±			±	
bta-miR-199b	0,0005	±	0,0001		±	
bta-miR-208b		±			±	
bta-miR-199c	0,0023	±	0,0022	0,0034	±	0,0046
bta-miR-20a	0,0307	±	0,0180	0,0477	±	0,0090
bta-miR-19a	0,0213	±	0,0075	0,0072	±	0,0021
bta-miR-20b	0,0131	±	0,0079	0,0190	±	0,0042
bta-miR-19b	0,0129	±	0,0103	0,0071	±	0,0013
bta-miR-21-3p	0,0001	±	0,0000	0,0001	±	0,0000
bta-miR-200a	0,0179	±	0,0153		±	
bta-miR-21-5p	0,0019	±	0,0016	0,0017	±	0,0003
bta-miR-200b	0,1119	±	0,0802	0,0380	±	0,0602
bta-miR-210	0,0025	±	0,0019	0,0031	±	0,0014
bta-miR-211	0,0009	±	0,0002	0,0007	±	0,0003
bta-miR-22-5p	0,0010	±	0,0006	0,0005	±	0,0002
bta-miR-212		±			±	
bta-miR-221	0,0010	±	0,0004	0,0009	±	0,0008
bta-miR-214	0,0005	±	0,0001	0,0010	±	0,0007

bta-miR-222	0,0024	±	0,0021	0,0028	±	0,0021
bta-miR-215	0,0023	±	0,0013	0,0017	±	0,0005
bta-miR-223	0,0008	±	0,0004	0,0005	±	0,0004
bta-miR-216a	0,0002	±	0,0002	0,0002	±	0,0001
bta-miR-224	0,0003	±	0,0002		±	
bta-miR-216b	0,0001	±	0,0000	0,0005	±	0,0004
bta-miR-23a	0,0431	±	0,0302	0,0120	±	0,0139
bta-miR-217		±			±	
bta-miR-23b-3p	0,0128	±	0,0099	0,0052	±	0,0034
bta-miR-218		±			±	
bta-miR-23b-5p	0,0008	±	0,0001	0,0002	±	0,0002
bta-miR-219	0,0011	±	0,0002	0,0015	±	0,0006
bta-miR-24	0,0003	±	0,0002	0,0003	±	0,0000
bta-miR-219-3p	0,0003	±	0,0001	0,0007	±	0,0003
bta-miR-24-3p	0,0334	±	0,0257	0,0125	±	0,0156
bta-miR-219-5p		±			±	
bta-miR-25	0,0172	±	0,0086	0,0173	±	0,0026
bta-miR-22-3p		±			±	
bta-miR-26a	0,0342	±	0,0228	0,0205	±	0,0060
bta-miR-26b	0,0068	±	0,0050	0,0040	±	0,0018
bta-miR-29d-3p	0,0057	±	0,0046	0,0041	±	0,0052
bta-miR-26c		±			±	
bta-miR-29d-5p	0,0010	±	0,0000		±	
bta-miR-27a-3p	0,0132	±	0,0101	0,0055	±	0,0072
bta-miR-29e	0,0005	±	0,0004		±	
bta-miR-27a-5p	0,0008	±	0,0001	0,0004	±	0,0005
bta-miR-301a	0,0004	±	0,0000	0,0004	±	0,0001
bta-miR-27b	0,0215	±	0,0178	0,0094	±	0,0071
bta-miR-301b		±		0,0003	±	0,0001
bta-miR-28	0,0015	±	0,0013	0,0022	±	0,0014
bta-miR-302a	0,0028	±	0,0010	0,0054	±	0,0017
bta-miR-296-3p	0,0016	±	0,0006	0,0031	±	0,0006
bta-miR-302b	0,0016	±	0,0004	0,0031	±	0,0012
bta-miR-296-5p	0,0005	±	0,0003	0,0008	±	0,0002
bta-miR-302c	0,0006	±	0,0006	0,0008	±	0,0001
bta-miR-299	0,0002	±	0,0000		±	
bta-miR-302d	0,0086	±	0,0049	0,0132	±	0,0063
bta-miR-29a	0,0189	±	0,0123	0,0064	±	0,0090
bta-miR-3064	0,0009	±	0,0001	0,0003	±	0,0002
bta-miR-29b	0,0031	±	0,0024	0,0014	±	0,0017
bta-miR-30a-5p	0,0142	±	0,0109	0,0123	±	0,0029
bta-miR-29c	0,0203	±	0,0158	0,0059	±	0,0091
bta-miR-30b-3p		±			±	

bta-miR-30b-5p	0,0058	±	0,0044	0,0032	±	0,0012
bta-miR-328	0,0011	±	0,0010	0,0023	±	0,0017
bta-miR-30c	0,0147	±	0,0116	0,0088	±	0,0044
bta-miR-329a		±			±	
bta-miR-30d	0,0128	±	0,0103	0,0135	±	0,0032
bta-miR-329b		±			±	
bta-miR-30e-5p	0,0150	±	0,0118	0,0136	±	0,0026
bta-miR-330	0,0007	±	0,0005	0,0005	±	0,0003
bta-miR-30f	0,0065	±	0,0058	0,0038	±	0,0023
bta-miR-331-3p	0,0006	±	0,0000	0,0002	±	0,0002
bta-miR-31	0,0223	±	0,0158	0,0056	±	0,0084
bta-miR-331-5p	0,0005	±	0,0005	0,0006	±	0,0000
bta-miR-32	0,0005	±	0,0003		±	
bta-miR-335	0,0003	±	0,0003		±	
bta-miR-320a	0,0136	±	0,0071	0,0150	±	0,0015
bta-miR-338	0,0003	±	0,0001	0,0004	±	0,0003
bta-miR-320b	0,0016	±	0,0018	0,0008	±	0,0008
bta-miR-339a	0,0022	±	0,0022	0,0021	±	0,0010
bta-miR-323		±			±	
bta-miR-339b	0,0026	±	0,0026	0,0021	±	0,0008
bta-miR-324	0,0008	±	0,0008	0,0006	±	0,0002
bta-miR-33a	0,0011	±	0,0006	0,0002	±	0,0001
bta-miR-326	0,0016	±	0,0012	0,0028	±	0,0022
bta-miR-33b	0,0002	±	0,0001	0,0001	±	0,0001
bta-miR-340		±			±	
bta-miR-365-3p	0,0012	±	0,0011	0,0006	±	0,0004
bta-miR-342	0,0024	±	0,0011	0,0015	±	0,0009
bta-miR-365-5p	0,0013	±	0,0012	0,0020	±	0,0019
bta-miR-345-3p	0,0007	±	0,0005	0,0007	±	0,0003
bta-miR-367		±			±	
bta-miR-345-5p	0,0009	±	0,0002	0,0007	±	0,0006
bta-miR-369-3p	0,0002	±	0,0001	0,0004	±	0,0001
bta-miR-346	0,0033	±	0,0027	0,0014	±	0,0009
bta-miR-369-5p		±			±	
bta-miR-34a	0,0048	±	0,0042	0,0030	±	0,0031
bta-miR-370	0,0009	±	0,0002	0,0011	±	0,0008
bta-miR-34b	0,0041	±	0,0030	0,0017	±	0,0010
bta-miR-371	0,1015	±	0,0383	0,1270	±	0,0141
bta-miR-34c	0,0084	±	0,0001	0,0018	±	0,0015
bta-miR-374a	0,0027	±	0,0025	0,0019	±	0,0006
bta-miR-361	0,0014	±	0,0016	0,0012	±	0,0006
bta-miR-374b	0,0026	±	0,0023	0,0013	±	0,0009
bta-miR-362-3p	0,0007	±	0,0004		±	

bta-miR-375	0,0019	±	0,0012	0,0009	±	0,0006
bta-miR-362-5p	0,0008	±	0,0004	0,0008	±	0,0005
bta-miR-376a	0,0007	±	0,0002		±	
bta-miR-363	0,0004	±	0,0002		±	
bta-miR-376b		±			±	
bta-miR-376c	0,0010	±	0,0008	0,0003	±	0,0001
bta-miR-382	0,0012	±	0,0005	0,0026	±	0,0011
bta-miR-376d	0,0004	±	0,0002	0,0000	±	0,0000
bta-miR-383		±			±	
bta-miR-376e		±		0,0002	±	0,0000
bta-miR-409a	0,0001	±	0,0001	0,0001	±	0,0000
bta-miR-377	0,0003	±	0,0001	0,0003	±	0,0002
bta-miR-409b		±			±	
bta-miR-378	0,0285	±	0,0250	0,0290	±	0,0141
bta-miR-410	0,0004	±	0,0001	0,0002	±	0,0000
bta-miR-378b	0,0266	±	0,0221	0,0289	±	0,0166
bta-miR-411a	0,0014	±	0,0008	0,0023	±	0,0009
bta-miR-378c	0,0024	±	0,0021	0,0023	±	0,0014
bta-miR-411b	0,0004	±	0,0001	0,0002	±	0,0001
bta-miR-378d	0,0015	±	0,0013	0,0008	±	0,0002
bta-miR-411c-3p	0,0008	±	0,0011	0,0005	±	0,0004
bta-miR-379	0,0017	±	0,0007	0,0014	±	0,0009
bta-miR-411c-5p	0,0004	±	0,0002		±	
bta-miR-380-3p	0,0006	±	0,0002	0,0005	±	0,0005
bta-miR-412		±			±	
bta-miR-380-5p	0,0007	±	0,0003	0,0010	±	0,0012
bta-miR-421	0,0049	±	0,0018	0,0053	±	0,0036
bta-miR-381	0,0007	±	0,0006	0,0007	±	0,0002
bta-miR-423-3p	0,0042	±	0,0021	0,0040	±	0,0019
bta-miR-423-5p	0,0032	±	0,0021	0,0034	±	0,0013
bta-miR-449c		±		0,0006	±	0,0000
bta-miR-424-3p	0,0004	±	0,0002	0,0004	±	0,0002
bta-miR-449d	0,0020	±	0,0007	0,0037	±	0,0024
bta-miR-424-5p	0,0182	±	0,0159	0,0091	±	0,0055
bta-miR-450a	0,0003	±	0,0003	0,0001	±	0,0001
bta-miR-425-3p		±		0,0248	±	0,0104
bta-miR-450b		±		0,0002	±	0,0001
bta-miR-425-5p	0,0030	±	0,0011	0,0023	±	0,0005
bta-miR-451	0,0071	±	0,0049	0,0052	±	0,0070
bta-miR-429	0,0081	±	0,0047	0,0044	±	0,0023
bta-miR-452		±		0,0001	±	0,0001
bta-miR-431	0,0008	±	0,0004		±	
bta-miR-4523	0,0006	±	0,0004	0,0003	±	0,0002

bta-miR-432		±		0,0003	±	0,0002
bta-miR-453	0,0012	±	0,0008	0,0005	±	0,0003
bta-miR-433	0,0028	±	0,0009	0,0032	±	0,0017
bta-miR-454		±			±	
bta-miR-448		±			±	
bta-miR-455-3p		±			±	
bta-miR-449a	0,0018	±	0,0005	0,0005	±	0,0004
bta-miR-455-5p	0,0005	±	0,0004	0,0004	±	0,0001
bta-miR-449b	0,0005	±	0,0000	0,0002	±	0,0003
bta-miR-483	0,0002	±	0,0001	0,0004	±	0,0000
bta-miR-484	0,0008	±	0,0004	0,0004	±	0,0001
bta-miR-496		±		0,0001	±	0,0000
bta-miR-485		±		0,0003	±	0,0002
bta-miR-497	0,0009	±	0,0002	0,0009	±	0,0006
bta-miR-486	0,0025	±	0,0017	0,0028	±	0,0026
bta-miR-499	0,0020	±	0,0007	0,0013	±	0,0006
bta-miR-487a	0,0007	±	0,0006	0,0004	±	0,0001
bta-miR-500	0,0007	±	0,0004	0,0018	±	0,0005
bta-miR-487b	0,0004	±	0,0003	0,0006	±	0,0006
bta-miR-502a		±			±	
bta-miR-488	0,0003	±	0,0001		±	
bta-miR-502b	0,0004	±	0,0001	0,0005	±	0,0001
bta-miR-489	0,0006	±	0,0004	0,0002	±	0,0001
bta-miR-503-3p	0,0055	±	0,0040	0,0043	±	0,0023
bta-miR-490	0,0003	±	0,0001		±	
bta-miR-503-5p	0,0066	±	0,0058	0,0036	±	0,0006
bta-miR-491	0,0005	±	0,0005	0,0005	±	0,0004
bta-miR-504	0,0002	±	0,0001		±	
bta-miR-493	0,0021	±	0,0024	0,0027	±	0,0014
bta-miR-505	0,0032	±	0,0016	0,0029	±	0,0012
bta-miR-494	1,0887	±	1,0737	0,5637	±	0,2713
bta-miR-532	0,0012	±	0,0007	0,0022	±	0,0002
bta-miR-495	0,0004	±	0,0002		±	
bta-miR-539		±			±	
bta-miR-541	0,0045	±	0,0011	0,0043	±	0,0023
bta-miR-582		±			±	
bta-miR-542-5p	0,0005	±	0,0002	0,0003	±	0,0001
bta-miR-584	0,0015	±	0,0001	0,0013	±	0,0004
bta-miR-543	0,0002	±	0,0002	0,0002	±	0,0001
bta-miR-592	0,0004	±	0,0001	0,0003	±	0,0001
bta-miR-544a		±			±	
bta-miR-599		±			±	
bta-miR-544b		±			±	

bta-miR-615	±			±
bta-miR-545-3p	±		0,0003	± 0,0001
bta-miR-628	±			±
bta-miR-545-5p	±		0,0005	± 0,0004
bta-miR-631	±			±
bta-miR-551a	±			±
bta-miR-652	0,0031	± 0,0024	0,0021	± 0,0002
bta-miR-551b	±			±
bta-miR-653	±			±
bta-miR-562	±			±
bta-miR-654	0,0020	± 0,0015	0,0021	± 0,0007
bta-miR-568	±			±
bta-miR-655	±			±
bta-miR-574	0,0525	± 0,0361	0,0543	± 0,0451
bta-miR-656	0,0011	± 0,0004	0,0012	± 0,0007
bta-miR-658	0,0004	± 0,0004	0,0009	± 0,0004
bta-miR-758	0,0001	± 0,0001	0,0001	± 0,0000
bta-miR-660	0,0017	± 0,0001	0,0012	± 0,0007
bta-miR-759	±			±
bta-miR-664a	0,0131	± 0,0040	0,0162	± 0,0036
bta-miR-760-3p	0,0009	± 0,0004	0,0006	± 0,0003
bta-miR-664b	0,0107	± 0,0020	0,0088	± 0,0070
bta-miR-760-5p	0,0137	± 0,0077	0,0105	± 0,0052
bta-miR-665	0,0076	± 0,0020	0,0131	± 0,0034
bta-miR-761	0,0001	± 0,0001	0,0002	± 0,0001
bta-miR-669	0,0089	± 0,0082	0,0102	± 0,0085
bta-miR-763	0,0012	± 0,0009	0,0006	± 0,0009
bta-miR-670	±			±
bta-miR-764	±			±
bta-miR-671	0,0001	± 0,0000		±
bta-miR-767	0,0013	± 0,0002	0,0012	± 0,0006
bta-miR-677	0,0766	± 0,0384	0,0864	± 0,0200
bta-miR-769	0,0003	± 0,0003	0,0015	± 0,0014
bta-miR-7	0,0045	± 0,0028	0,0092	± 0,0018
bta-miR-873	0,0002	± 0,0001		±
bta-miR-708	0,0013	± 0,0007	0,0014	± 0,0007
bta-miR-874	0,0229	± 0,0123	0,0229	± 0,0090
bta-miR-744	0,0011	± 0,0009	0,0011	± 0,0002
bta-miR-875	±			±
bta-miR-876	±			±
bta-miR-98	0,0005	± 0,0001		±
bta-miR-877	±		0,0083	± 0,0051
bta-miR-99a-3p	±			±

bta-miR-885	0,0005	±	0,0001	0,0009	±	0,0008
bta-miR-99a-5p	0,0008	±	0,0005	0,0010	±	0,0008
bta-miR-9-3p		±			±	
bta-miR-99b	0,7127	±	0,6851	0,1493	±	0,0522
bta-miR-9-5p	0,0078	±	0,0040	0,0117	±	0,0040
bta-miR-1179		±			±	
bta-miR-92a	0,0207	±	0,0130	0,0278	±	0,0022
bta-miR-1185		±			±	
bta-miR-92b	0,0142	±	0,0041	0,0203	±	0,0057
bta-miR-1193		±			±	
bta-miR-93	0,0123	±	0,0073	0,0164	±	0,0015
bta-miR-1197		±		0,0002	±	0,0000
bta-miR-935	0,0014	±	0,0015		±	
bta-miR-122	0,0005	±	0,0003	0,0003	±	0,0001
bta-miR-940	0,0593	±	0,0224	0,1094	±	0,0206
bta-miR-1224	0,1021	±	0,0476	0,1309	±	0,0405
bta-miR-95	0,0025	±	0,0019	0,0012	±	0,0012
bta-miR-1225-3p	0,0203	±	0,0135	0,0358	±	0,0155
bta-miR-96	0,0010	±	0,0004	0,0003	±	0,0002
bta-miR-1246		±			±	
bta-miR-1247-3p	0,0019	±	0,0009	0,0033	±	0,0016
bta-miR-1296	0,0032	±	0,0010	0,0020	±	0,0017
bta-miR-1247-5p	0,0138	±	0,0095	0,0210	±	0,0074
bta-miR-1298		±			±	
bta-miR-1248	0,0470	±	0,0329	0,0462	±	0,0266
bta-miR-1301		±		0,0001	±	0,0001
bta-miR-1249	0,0013	±	0,0003	0,0012	±	0,0007
bta-miR-1306	0,0015	±	0,0012	0,0008	±	0,0002
bta-miR-1260b	0,7071	±	0,2237	1,3978	±	1,1260
bta-miR-1307	0,0223	±	0,0144	0,0236	±	0,0099
bta-miR-1271	0,0055	±	0,0038	0,0069	±	0,0046
bta-miR-1343-3p	0,0060	±	0,0034	0,0079	±	0,0026
bta-miR-1277		±			±	
bta-miR-1343-5p	0,0872	±	0,0522	0,0849	±	0,0244
bta-miR-1281	0,0059	±	0,0037	0,0081	±	0,0029
bta-miR-1388-3p	0,0011	±	0,0011	0,0019	±	0,0006
bta-miR-1282		±			±	
RT43 soRA	0,1262	±	0,0462	0,1453	±	0,0297
bta-miR-1284		±			±	
Hm/Ms/Rt T1 sRA	12,2411	±	6,1340	19,9549	±	4,0557
bta-miR-1287	0,0003	±	0,0002	0,0004	±	0,0002
bta-miR-99b	0,7158	±	0,6969	0,2255	±	0,1032
bta-miR-1291	0,0073	±	0,0063	0,0058	±	0,0094

12.- ANEXO

ANEXO 1.- Reprodução autorizada pela Nature Publishing Group do manuscrito intitulado “Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes” (SREP-16-50815A) publicado no periódico Scientific Reports.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes

Received: 12 December 2016
Accepted: 11 April 2017
Published online: 01 June 2017

Maite del Collado , Juliano Coelho da Silveira, Juliano Rodrigues Sangalli, Gabriella Mamede Andrade, Leticia Rabello da Silva Sousa, Luciano Andrade Silva, Flavio Vieira Meirelles & Felipe Perecin

Oocytes that undergo *in vitro* maturation (IVM) are metabolically abnormal and accumulate excess lipid content. However, the mechanism of lipid accumulation and the role of cumulus cells in this process are unclear. Recently, it was shown that fatty acid binding proteins (FABPs) performed intra- and extracellular fatty acid transport. We postulated that FABP3 might be responsible for fatty acid transport from cumulus cells to the oocytes *via* transzonal projections (TZPs) during IVM. Transcript and protein levels of FABP3 were analyzed in both *in vivo*- and *in vitro*-matured cumulus-oocyte-complexes and were increased in IVM samples. Further analysis showed increased lipid content in oocytes and cumulus cells in IVM samples compared to *in vivo*-derived. We therefore speculated that altered traffic of fatty acids *via* FABP3 during IVM was the mechanism leading to the excess of lipids accumulated within IVM oocytes. Furthermore, we demonstrated an increase in FABP3 levels and lipid content during the first 9 h of IVM, further strengthening the possibility of fatty acid transport *via* FABP3 and TZPs. Additionally, disruptions of TZPs during IVM decreased lipid accumulation in oocytes. Our results shed light on a possible mechanism involving FABP3 and TZPs that causes excess lipid accumulation in oocytes during IVM.

Assisted reproductive technologies (ARTs) expose gametes and embryos to non-physiological conditions that may cause abnormal development. Increased lipid accumulation during *in vitro* production (IVP) of bovine embryos is one of the most well recognized metabolic abnormalities that accompany the outcome of successful ARTs. The negative effects of increased lipid content in blastomeres include reduced potential for cryopreservation and poor post-thawing embryo survival rates, resulting in low rates of pregnancy and embryo losses^{1,2}. Studies on bovine embryos produced using different IVP systems have provided compelling evidence for correlation between lipid-rich culture media supplemented with fetal bovine serum (FBS) and high lipid content as well as low cryotolerance of blastocysts^{3–5}. It was demonstrated that the lipid accumulation in species such as bovine and mouse occurs during the first step of IVP, the *in vitro* maturation (IVM) of oocytes^{3,6}, and that it does not occur when the maturation takes place *in vivo*³. Furthermore, the lipid accumulation was accentuated when the oocytes were matured in the presence of FBS³. Additionally, similar events were observed *in vivo*, when cumulus-oocyte complexes (COCs) were exposed to lipid-rich environments such as follicular fluids of obese women; this exposure may be responsible for excessive lipid accumulation in oocytes, leading to impaired fertility^{7–11}.

Communication between cumulus cells and oocytes is important for optimal oocyte maturation. This communication is mediated by paracrine signals, transzonal projections (TZPs), gap junctions and possibly extracellular vesicles^{12,13}. Despite the paracrine signals, molecules could be transported within TZPs and be transferred to the oocyte by GAP junctions or by the recently proposed extracellular vesicle mediated intercellular transport^{13,14}. Gap junctions can transport low-weight molecules (<1 kDa) important for oocyte development, such as ions, nucleotides, amino acids, and metabolites, and are functional during the first 6 h of IVM^{15,16}. TZPs are large

Veterinary Medicine Department, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of Sao Paulo, Av. Duque de Caxias Norte 225, 13635-900, Pirassununga, SP, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.P. (email: fperecin@usp.br)

channels, $\sim 2\mu\text{m}$ in diameter, that allow the transport of large molecules such as mRNAs to oocytes until $\sim 9\text{h}$ after the resumption of meiosis¹³. Exchange of lipids between cumulus cells and oocytes or lipid carriers for fatty acid transport have not been observed in this system so far.

Fatty acid molecules are transported intra- and extracellularly by a family of lipid-binding proteins called Fatty Acid Binding Proteins (FABP); 9 isoforms of FABPs have been reported¹⁷. These proteins bind mostly to long chain fatty acids (C16–C20) and transport them to the peroxisome, mitochondria or endoplasmic reticulum^{18–20}. FABPs also transport lipids extracellularly, and have been observed free or enclosed in extracellular vesicles in several tissues and body fluids; they thus serve pleiotropic functions in systemic metabolism^{17,21}. Isoform 3 of these lipid-binding proteins, called FABP3 or heart-FABP, seems to have altered functionality within COCs because its transcript levels were reported to be increased during IVM²².

Even though the dynamic interaction between cumulus cells and oocytes as well as the transport of several molecules into COCs are well known, there is still a gap in the knowledge of the mechanism of lipid metabolism in these complexes during *in vivo* or IVM. In this study, we used an animal model to investigate lipid transport in COCs during oocyte maturation. This model allowed us to study the roles of FABP3 and TZPs in lipid accumulation as well as the influence of the *in vitro* environment imposed by ARTs on the lipid accumulation in COCs.

We demonstrated the transport of FABP3 between cumulus cells and oocytes through TZPs during IVM. This traffic is maintained until around 9 h after the beginning of IVM, and is consistent with the period at which higher FABP3 expression and lipid accumulation was observed in the oocytes. Additionally, blocking TZP formation resulted in reduced lipid droplets content in oocytes undergoing IVM. Our data also suggested that IVM altered the FABP3-mediated accumulation of lipids in COCs. To the best of our knowledge, this is the first manuscript to describe a mechanism of lipid transport within COCs. The data presented here will provide new insights that help elucidate the mechanism behind lipid accumulation during IVM and potentially lead to the development of new approaches to improve ARTs.

Results

IVM leads to increased lipid content in COCs. To investigate the dynamics of lipid accumulation *in vivo* and IVM, we estimated the lipid content in cumulus cells and oocytes. Higher amounts of lipid droplets were observed in both cumulus cells (Fig. 1a and Supplementary Fig. S2a) and oocytes obtained after IVM (Fig. 1b and Supplementary Fig. S1). The results demonstrated that IVM caused an increase in lipid content, whereas *in vivo* cumulus cells and oocytes had lipid content similar to that in the immature group.

IVM increases FABP3 transcript and protein levels in cumulus cells. In order to investigate the effect of IVM on FABP3 function, we determined the transcript and protein levels of FABP3 in cumulus cells derived from immature, *in vivo*- and *in vitro*-matured COCs. We observed that the relative amount of FABP3 transcripts increased in cumulus cells after IVM of COCs (Fig. 1c). Interestingly, no difference was observed in the relative levels of FABP3 transcripts in oocytes before and after IVM (Fig. 1c). Similarly, FABP3 protein levels in cumulus cells obtained from COCs that underwent IVM were also found to be higher than those in immature and *in vivo*-matured cells (Fig. 1d and Supplementary Fig. S2b). Our data demonstrated that *in vitro*-matured COCs had higher transcript and protein levels of FABP3 in cumulus cells.

FABP3 is localized within TZPs during IVM. Next, we aimed to investigate whether FABP3 was localized along with the TZPs during IVM. We obtained a series of immunostained images of immature COCs as well as COCs matured *in vitro* for 9 or 18 h. We observed that FABP3 was present within TZPs in immature COCs (Fig. 2 and Supplementary Fig. S3). After 9 h of IVM, the amount of FABP3 present in TZPs increased (Fig. 3 and Supplementary Fig. S4). To verify the presence of FABP3 within TZPs across the zona pellucida (ZP), we subjected oocytes that were either denuded and partially denuded to maturation for 9 h, and then again carried out immunostaining for FABP3 (Fig. 4 and Supplementary Figs S5 and S6). We were unable to detect FABP3 in the ZP of denuded oocytes, suggesting that the presence of TZPs is necessary for the transport of FABP3 between the cumulus and oocytes (Fig. 4a and b). Furthermore, in partially denuded oocytes, we only detected FABP3 along with the TZPs in the ZP (Fig. 4c and d), ruling out the possibility that FABP3 moves between the cumulus and oocytes using other mechanisms. Additionally, because the TZP-mediated transport ceased when oocytes became mature, we investigated the location of FABP3 and TZPs after 18 h of IVM. As expected, we observed that the TZPs were disconnected from the ooplasm and the FABP3 was localized at the terminal portion of the TZPs (Fig. 5 and Supplementary Fig. S7), suggesting that it was derived from cumulus cells. In summary, our results demonstrated that FABP3 was present within TZPs in immature and 9-h matured COCs (Fig. 6a and b). In addition, after 18 h of maturation, when the first polar body was extruded, the TZPs were disconnected from the ooplasm and the FABP3 molecules accumulated at the terminal portion of these projections (Fig. 6c). We also performed a negative control for each immunoreaction: we exposed the samples to the maximum laser potency during confocal microscopy and did not detect any signals in the zona pellucida, ruling out the possibility that our signals are artifacts (Supplemental Fig. S8).

FABP3 protein levels and lipid droplets increase until up to 9 h in oocytes during IVM. Since our data suggested the movement of FABP3 from cumulus to oocytes, we expected an increase in the FABP3 protein levels as well as the lipid content in oocytes during IVM. To verify this, we conducted western blot analysis and lipid droplets staining in immature oocytes and in oocytes that underwent IVM for 9 and 18 h. The protein analysis revealed a ~ 1.55 -fold increase in FABP3 levels between immature oocytes and 9-h matured ones, while no difference was observed between 9-h and 18-h matured oocytes (Fig. 7a and Supplementary Fig. S2c). The lipid droplet analysis showed a ~ 1.44 -fold increase in lipid accumulation in 9-h matured oocytes compared to immature ones (Fig. 7b). Interestingly, no differences were observed between 9- and 18-h matured oocytes, suggesting

Figure 1. Quantification of lipid content in cumulus cells and oocytes derived from immature, *in vivo*-matured and *in vitro*-matured cumulus-oocyte complexes (COCs). (A) Lipid content in cumulus cells was determined by western blot analysis of perilipin 2 (PLIN2) using histone 3 (H3) as a normalizer. (B) Lipid quantification in oocytes was performed by fluorescence confocal microscopy of lipid droplets. The values for lipid content represent the ratio of area of lipid droplets to total oocyte area. Representative immature, *in vivo*-matured and *in vitro*-matured oocytes stained with BODIPY 493/503 are shown in Supplementary Fig. S1. (C) Relative amounts of fatty acid binding protein 3 (FABP3) transcripts in immature, *in vivo*-, and *in vitro*-matured cumulus cells and oocytes. (D) FABP3 protein levels in cumulus cells normalized by x-Tubulin (TUBA). Lowercase letters above bars in the same graph indicate significant differences ($P < 0.05$). Values are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. The full western blot images in (A) and (D) are shown in Supplementary Fig. S2a and S2b, respectively. *The order of the groups is different between the graph and the representative immunoblot images.

that there was no lipid accumulation during this time. Thus, our results suggested that there was simultaneous accumulation of FABP3 as well as lipids in the oocytes during the first 9 h of IVM.

The disruption of TZPs in oocytes causes decrease in lipid content. Because our results suggested that lipids are transported from cumulus cells to oocytes in a TZP-dependent manner, we decided to disrupt the TZPs to further clarify its role in lipid accumulation. To this end, we utilized cytochalasin B, an agent that blocks the polymerization of actin filaments and thus disrupts the TZPs. We exposed the COCs to cytochalasin B during the first 9 h of IVM to verify whether the lipid content was affected. Our results demonstrated that most of the TZPs were disrupted by cytochalasin B during IVM (Figs 8a–d and Supplementary Fig. S10). The total

Figure 2. Confocal microscopic analysis demonstrating the presence of fatty acid binding protein 3 (FABP3) within the transzonal projections (TZPs) of immature cumulus-oocyte-complexes (COCs). FABP3 was immunostained using 488 Alexa Fluor (green); TZPs (actin) were labeled with Alexa Fluor 647 phalloidin (red) and nuclei were stained with DAPI (blue). (A) Photomicrographs of immature COCs were obtained in 63 x objective and (B) in 63 x objective zoomed 3.5 x. (C) Digital zoom showing FABP3 (arrow) within TZPs (asterisk) in zona pellucida (OO = oocyte; CC = cumulus cells). A total of 12 immature COCs were analysed and showed similar pattern; 6 additional COCs are shown in Supplementary Fig. S3.

lipid content in oocytes that matured in the presence of cytochalasin B was lower than that in the control oocytes (Fig. 8e), indicating that functional TZPs are necessary to drive lipid accumulation.

Discussion

The increased lipid accumulation in *in vitro*-produced embryos is one of the major disadvantages of IVP, causing impaired cryotolerance and low pregnancy rates^{1,2}. It was demonstrated that this accumulation is one of the consequences of IVM in species such as bovine and mouse, and in bovine is caused by exposure of the gametes to a non-physiological environment^{3,6}. In the present study, we proposed that the excessive lipid accumulation in *in vitro*-matured oocytes is mediated by the dysregulated transport of a fatty acid lipid-carrier protein named FABP3 through TZPs. We demonstrated that the *in vitro* system caused an increase in FABP3 levels. Additionally, an increase in lipid content during IVM was associated with the increase in FABP3 protein levels in *in vitro*-matured cumulus cells. By comparing immature oocytes with 9- and 18-h matured ones, we observed the presence of FABP3 within TZPs during IVM as well as dynamic changes in FABP3 protein levels and lipid levels in oocytes during the maturation process. In addition, we showed that the disruption of TZPs in oocytes during the first 9 h of maturation decreased the lipid accumulation. Thus, our results demonstrated, for the first time, a probable mechanism for the transport of fatty acids from cumulus cells to the oocytes, which may be responsible for the lipid accumulation in oocytes.

Lipid transportation from the medium to the cells or among the cells in *in vitro* systems has been extensively investigated^{3,4,23} as a possible cause of lipids accumulation within *in vitro*-produced embryos. Many studies have reported that embryos cultured in media containing fetal bovine serum acquired more lipids and were less cryotolerant than those grown without serum^{4,5,23}. Based on that, a relationship between the lipid content of the maturation medium and the elevated lipid levels observed in oocytes after IVM has been established. However, the mechanisms mediating lipid transport within COCs during IVM have never been identified and remains unknown.

We observed that FABP3 was localized along the TZPs during IVM, suggesting that FABP3 molecules that originated from the cumulus may transport fatty acids from these cells to the oocytes, and eventually end up in

Figure 3. Confocal photomicrographs of fatty acid binding protein 3 (FABP3) immunodetection in transzonal projections (TZPs) after 9 h of *in vitro* maturation (IVM). FABP3 is immunostained using 488 Alexa Fluor (green); TZPs (actin) are stained with Alexa Fluor 647 phalloidin (red); nuclei are stained with DAPI (blue). (A) Photomicrographs of COCs after 9 h of IVM were obtained in 63x objective and (B) in 63x objective zoomed 3.5x. (C) Digital zoom showing FABP3 (arrow) along TZPs (asterisk) in the zona pellucida (OO = oocyte; CC = cumulus cells). A total of 12 COCs *in vitro*-matured for 9 hours were analysed and showed similar pattern; 6 additional COCs are shown in Supplementary Fig. S4.

the oocytes. TZPs, also known as cumulus cells process endings (CCPEs)^{24,25}, are able to transport molecules <1 kDa to the oocyte by GAP junction located at the final portion of TZPs^{26,27} or by the recently proposed traffic of extracellular vesicles into the cleft between the end of TZPs and the oolema^{13,28}. Based on the molecular weight of FABP3 (>1 kDa), the transport to oocytes mediated by vesicles is the probable mechanism. This supposition finds a parallel in the reports of transport of large molecules such as mRNA from cumulus cells to the oocytes mediated by TZPs within COCs^{13,29}. Additionally, FABP5 as well as other members of this protein family such as FABP4 and FABP3 were described in extracellular vesicles from different body fluids^{17,30–34}. Thus, based on the presence of extracellular vesicles in the cleft between TZPs and the ooplasm¹³, a reasonable hypothesis is that FABP3s are transported to the oocyte by extracellular vesicles secreted by cumulus cells.

The family of FABP proteins was for a long time associated with intracellular fatty acid transport, mostly to the mitochondria, where β -oxidation takes place. However, recently, FABP proteins were discovered to possess extracellular functions as well, carrying lipids between tissues³⁵. Additionally, studies have reported that extracellular FABP proteins were altered in metabolism-associated diseases^{17,30,36–41}. Cardiac FABP, also known as H-FABP or FABP3, was first observed in reproductive tissues such as ovary and placenta, where it performed both intra- and extracellular functions^{17,30}. Based on the current literature, FABP3 and FABP5 are the only FABPs expressed in bovine COCs, but only FABP3 increased during IVM in bovine oocytes, suggesting a possible role in lipid accumulation^{22,42}.

Exposure of muscle cells to high levels of fatty acids both *in vivo* and *in vitro* induced the expression of FABP3^{43,44}. Because we observed an increased lipid accumulation in COCs, we decided to investigate whether FABP3 in cumulus cells were altered after IVM. We demonstrated an increase in lipid content as well as FABP3 transcript and protein levels in cumulus cells undergoing IVM. We also observed an increase in lipid content in oocytes after exposure to an *in vitro* environment, suggesting that FABP3 might be involved in extracellular fatty acid transport as well, instead of only in the canonical intracellular function. Additionally, *in vivo*-matured cumulus cells did not show any increase in the levels of FABP3 compared to immature cumulus cells, indicating that

Figure 4. Confocal microscopic analysis of fatty acid binding protein 3 (FABP3) in transzonal projections (TZPs) of denuded and partially denuded oocytes cultured in the maturation media for 9 h. (A) Images acquired from denuded oocytes show no FABP3 and TZPs within the zona pellucida. (B) The image of a portion of the denuded oocytes demonstrating the complete absence of TZPs and FABP3 within the zona pellucida. (C) Images acquired from a partially denuded oocyte demonstrating the presence of FABP3 at the same location as TZPs within the zona pellucida. (D) The portion of the partially denuded COCs demonstrating the complete absence of TZPs and FABP3 within the zona pellucida in the denuded area, and the presence of FABP3 and TZPs in the cumulus-enclosed area. FABP3 (arrow) is immunostained using 488 Alexa Fluor (green); TZPs (actin; asterisk) are stained with Alexa Fluor 647 phalloidin (red); nuclei are stained with DAPI (blue). Photomicrographs were obtained in 63x objective (A and C), and merged with z-stack captures with digital zoom (B and D) to illustrate the absence (B) or presence (D) of FABP3 along the TZPs. (OO = oocyte; CC = cumulus cells). ** indicates the lack of cumulus cells and TZPs. A total of 10 denuded oocytes and 11 partially denuded oocytes *in vitro*-matured for 9 hours were analysed and showed similar pattern; 6 additional denuded oocytes and 6 additional partially denuded oocytes are shown in Supplementary Figs S5 and S6, respectively.

the *in vitro* system caused the dysregulation of lipid transport. Altogether, our data suggested that the mechanism leading to the increased lipid content observed in oocytes after IVM was mediated by FABP3.

From the results of our immunolocalization experiments we verified the relationship between FABP3 and lipid content in oocytes during the initial stage of IVM, by observing the co-localization of FABP3 and TZPs during the first 9 h of IVM. Therefore, the increased FABP3 levels and lipid content observed at this stage might have been caused by the transport of FABP3 through TZPs. We also demonstrated that after 18 h of IVM, the number of TZPs near the ooplasm decreased drastically, and that FABP3 molecules were localized at the terminal portion of the projections. The fact that FABP3 migrated only until the terminal portion of the TZPs and accumulated there, suggested that traffic occurs only from cumulus cells to oocytes and not in the opposite direction. The FABP3 levels and lipid content in the oocytes remained stable from 9 h to 18 h of IVM. Thus, the increase in FABP3 and lipids seemed to be dependent on the presence of active TZPs.

The necessity of functional TZPs to allow for lipid accumulation in oocytes is supported by the literature. The exposure of COCs to high levels of free fatty acid during the last 6 hours of *in vitro* maturation (considering a 23 h IVM) resulted in lipid accumulation in cumulus cells, but not into oocytes⁴⁵. Therefore, in moment where TZPs are no longer functional, the traffic of lipid from cumulus to oocytes seems to be impaired. Thus, previous work demonstrated increased accumulation of lipids within the cumulus cells, following the exposure of the COCs to rich-lipids environment⁴⁵; however, here we demonstrated a possible fatty acid transport mechanism from cumulus cells to oocyte during IVM.

To verify whether TZPs are involved in fatty acid transport from cumulus cells to oocytes, we disrupted TZPs using cytochalasin B during the first 9 h of IVM. Initially, we observed that cytochalasin B-treated oocytes lacked most of the TZPs because of the disruption and that FABP3 was not present within the ZP. Therefore,

Figure 5. Confocal microscopic analysis of cumulus-oocytes complexes (COCs) after 18 h of IVM. (A) Confocal photomicrographs of immunodetection of fatty acid binding protein 3 (FABP3) in transzonal projections (TZPs) in 18-h matured COCs. (B) Photomicrograph showing a detailed view of the COC using a 63x objective and zoomed 3.5x. (C) The digital zoom showing the details of the terminal portions of the TZPs disconnected from the ooplasm; FABP3 are immunolocalized at the terminal portion of the TZPs. FABP3 is immunostained using 488 Alexa Fluor (green); TZPs (actin) are stained with Alexa Fluor 647 phalloidin (red); nuclei are stained with DAPI (blue). Photomicrographs were obtained in 63 x objective (A) and in 63 x objective zoomed 3.5 x (B). Digital zoom (C) showing a few FABP3 molecules (arrow) in the terminal portion of TZPs (asterisk) and the perivitellin space (PVS) between oocyte (OO) and zona pellucida. (CC = cumulus cells; PB = polar body). A total of 15 COCs *in vitro*-matured for 18 hours were analysed and showed similar pattern; 6 additional COCs are shown in Supplementary Fig. S7.

our treatment disrupted the TZPs and blocked the transport of FABP3 from cumulus cells through the ZP. Additionally, we demonstrated a decrease in lipid content in the cytochalasin B-treated oocytes compared to the non-treated controls. Hence, disruption of TZPs decreased lipid accumulation in oocytes, impairing fatty acid transport from cumulus cells to oocytes, thus supporting our initial speculation.

The results of this work shed light on the effects of exposing gametes to *in vitro* culture conditions during ARTs. The reasons why *in vitro* maturation triggers lipid accumulation and FABP3 upregulation are still elusive. Lipid-rich *in vitro* environment do not seem to be responsible, as previously discussed³. Metabolic dysregulation (probably of cumulus cells), including abnormal energy metabolism and abnormal triacylglycerol synthesis, are the candidate pathways to trigger lipid accumulation. However, these hypotheses are yet to be confirmed. The results of this work also shed light on fertility impairment in women suffering from metabolic disorders. It is well known that women who are overweight and/or suffering from metabolic syndromes have several fertility problems associated with high lipid content in the blood, follicular fluids, and oocytes. This elevated level of lipid may trigger endoplasmic reticulum stress and consequently apoptosis in COCs due to a lipotoxicity response, leading to the decreased fertilization rates observed in these women^{9–11}. However, the mechanism behind this lipid accumulation remains unknown. Recent studies have identified high levels of FABP4 in the blood and tissues of patients with obesity¹⁷. Likewise, FABP3 levels were found to be increased in patients with metabolic syndrome⁴⁶. Even though these types of pathologies are increasingly becoming frequent among women and are amongst the major causes of modern fertility-related problems, we still do not understand the molecular mechanism underlying these issues.

Our results demonstrated that lipid accumulation during IVM was dependent upon the functional communication between cumulus cells and oocytes. We also suggested a possible mechanism for fatty acid transport from

Figure 6. Confocal microscopic analysis of cumulus-oocytes complexes (COCs) at different stages of oocyte maturation (merge of z-stack images) in 63 x objective with digital zoom. (A) Photomicrograph showing the localization of fatty acid binding protein 3 (FABP3) and transzonal projections (TZPs) in immature COCs. (B) Photomicrograph showing the localization of FABP3 and TZPs in COCs after 9 h of maturation. (C) Photomicrograph showing the localization of FABP3 and TZPs in COCs after 18 h of maturation. Arrows indicate FABP3 immunolocalized in TZPs. FABP3 is immunostained using 488 Alexa Fluor (green); TZPs (actin) are stained with Alexa Fluor 647 phalloidin (red); nuclei are stained with DAPI (blue).

Figure 7. Fatty acid binding protein 3 (FABP3) protein levels and lipid content in oocytes from immature cumulus-oocytes complexes (COCs) and COCs *in vitro*-matured for 9 and 18 h. (A) FABP3 protein quantification in oocytes was performed by western blot analysis using x-Tubulin (TUBA) as the normalizer. The full western blot image is shown in Supplementary Fig. S2c. (B) Lipid quantification in oocytes. The values for lipid content represent the ratio of the area of lipid droplets to the total oocyte area. Letters above bars in the same graph indicate significant difference ($P < 0.05$). Values are represented as mean $\pm$ standard error of the mean.

cumulus cells to oocytes *via* FABP3 and TZPs. We demonstrated the dysregulation of FABP3 synthesis and its accumulation in oocytes during IVM, concomitant with the lipid accumulation. We suggested that an increase of lipid accumulation in cumulus cells during IVM could lead to an increase of FABP3 expression levels to transport those fatty acids. Thus, this dysregulation in cumulus cells could lead to increased lipid accumulation in oocytes during IVM. Further experiments are necessary to verify this new mechanism of lipid accumulation in oocytes during IVM. Our data strongly suggested that fatty acid transport within COCs is mediated by FABP3 and that FABP3 may play a role in fertility issues. Finally, a better understanding of this mechanism of transport will help in the development of tools to modulate lipid accumulation in oocytes during IVM; this could have great

Figure 8. Confocal microscopic analysis of fatty acid binding protein 3 (FABP3) in cumulus-oocytes complexes (COCs) after *in vitro* maturation (IVM) in the absence (control) and presence of cytochalasin B. (A) and (C) The photomicrographs showing the presence of transzonal projections (TZPs) and FABP3 in the control group. (B) and (D) Photomicrographs showing the lack of most parts of TZPs and FABP3 within the zona pellucida. FABP3 was immunostained using 488 Alexa Fluor (green); TZPs (actin) are stained with Alexa Fluor 647 phalloidin (red); nuclei are stained with DAPI (blue). Photomicrographs were obtained in 63x objective (A and C); and in 63 x objective zoomed 3.5 x (B and D). CC = cumulus cells; ZP = zona pellucida; OO = oocyte. **Indicate the disassembly and blocking of TZP formation by cytochalasin B. A total of 10 control COCs and 10 cytochalasin treated COCs *in vitro*-matured for 9 hours were analysed and showed similar pattern; 6 additional control COCs and 6 additional cytochalasin B treated COCs are shown in Supplementary Fig. S10. (E) Lipid content in oocytes from COCs after IVM for 9 h in the absence (control) or presence of cytochalasin B. Lipid quantification was performed by fluorescence confocal microscopy to detect lipid droplets. Representative control and cytochalasin B-treated oocytes stained with BODIPY 493/503 are shown in Supplementary Fig. S11. The values for lipid content represent the ratio of the area of lipid droplets to the total oocyte area. Letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$). Values are represented as mean $\pm$ standard error of the mean.

implications for ARTs in animals and humans and for fertility treatments for women suffering from metabolic disorders.

Methods

All reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated. The Bioethical Committee of the FZEA - University of Sao Paulo, Pirassununga, SP, Brazil has approved this study under the protocol number 14.1.675.74.7. We adopted the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for the Study of Reproduction) as well.

The lipid content and FABP3 levels during *in vivo* and IVM. *Recovery of immature, in vitro-, and in vivo-matured oocytes.* In order to compare immature, *in vitro*-, and *in vivo*-matured oocytes and cumulus cells, Nellore (*Bos indicus*) COCs were obtained from slaughterhouses or from live cows by the ovum pick-up (OPU) method. To obtain oocytes for IVM, we performed follicular aspiration of the Nellore cow-ovaries obtained

post-mortem. To obtain *in vivo*-matured oocytes, we synchronized the ovarian follicular wave of cyclic Nellore cows and then subjected them to follicular superstimulation and OPU. The detailed protocols are presented in the supplementary materials and methods (Supplementary File).

Confocal microscopic analysis of lipid content in oocytes. Lipid quantifications analyses were performed by staining the lipid droplets with a dye specific for neutral lipids, – BODIPY 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), followed by confocal microscopy imaging. We utilized denuded oocytes from the three groups (49 immature, 46 *in vivo*-matured, and 45 *in vitro*-matured oocytes, obtained from 12 biological replicates) for confocal analysis. The denuded oocytes were fixed, permeabilized, and stained following the manufacturer's instructions. The oocytes were then analyzed using the LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 63X magnitude in oil with an Argon 488 laser. One image per oocyte was captured choosing the largest diameter section and later analyzed with the ImageJ program (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The ratio of the lipid droplet area to the total oocyte area was determined and analyzed with ImageJ, as previously described³. Briefly, lipid content in oocytes was visualized using fluorescence confocal microscopy and quantified based on the fraction of area occupied by lipid droplets within the ooplasm. To obtain area of lipid droplets, we transformed the original image to 8 bits image; and then we determined the lipid droplets area with a plugin named “nucleus counter” (detailed in Supplemental Fig. S9).

Quantification of PLIN2 and FABP3 in cumulus cells by western blot. Lipid content in cumulus cells was determined based on the amount of PLIN2, a protein present in lipid droplets and commonly used as a marker for lipid accumulation studies^{6,11,47,48}. To evaluate the levels of PLIN2 and FABP3 in cumulus cells, we performed western blot analysis for immature, *in vivo*-, and *in vitro*-matured cumulus cells. The proteins utilized in these analyses were from the same pool of samples that we used for the gene expression studies as we had stored the organic phase left over after RNA extraction using TRIzol reagent. The protein was isolated from the organic phase of the TRIzol reagent according to the manufacturer's instruction. To achieve the protein quantity required for western blot analysis, samples from the same biological group were pooled and analyzed in three technical replicates. A total of 50 µg of protein was loaded and resolved using a 10%-SDS- PAGE commercial kit, Mini-Protean TGX Gels (456–1033, Bio-RAD, Hercules, CA, USA). Electrophoresis was performed at 100 V for 70 min, and the proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride PVDF membrane using a Trans-Blot Turbo Transfer Pack (170–4156, Bio-RAD) in a semidry transfer apparatus, Trans-Blot Turbo, using a “mini TGX program” (3 min at 25 V constant). The membranes were then placed in a blocking buffer that had 5% bovine serum albumin (BSA) in tris buffered saline with tween (TBST) for 1 h at room temperature. Next, the membranes were incubated overnight with the primary antibody for PLIN2, anti-ADRP rabbit antibody (1:2000, SC32888, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), at 4°C. Following overnight incubation, the membranes were washed thrice for 5 min with TBST and then incubated with the secondary antibody, anti-rabbit conjugated with HRP antibody (1:2000, A0545, Sigma), for 1 h at room temperature. To detect FABP3, we used an anti-cardiac FABP rabbit antibody (1:2000, AB45966, Abcam) and the secondary anti-rabbit antibody conjugated with HRP (1:4000; A0545, Sigma). The membranes were again washed thrice in 1x TBST for 5 min. For detection, the membranes were subjected to a chemiluminescent reaction using the reagent ECL Plus Prime Western Blotting Detection System solution (Amersham™, Buckinghamshire, UK). Imaging and band density analyses were performed using ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad,) and the software Image Lab 5.1, respectively. The relative amounts of PLIN2 were normalized using the anti-histone H3 rabbit antibody (1:2000, H0164, Sigma) blotted in the same membrane. The relative amounts of FABP3 were normalized using the anti- α -Tubulin mouse antibody (1:2000, T9026, Sigma) and an anti-mouse antibody (1:2000, #70765, Cell Signaling) as endogenous controls.

Relative mRNA analysis. To investigate the levels of FABP3 transcript, we extracted mRNA from five pools, each of then containing 20 immatures and *in vivo*- and *in vitro*-matured denuded oocytes (in MII phase) that were collected from 12 biological replicates of *in vivo* and *in vitro* maturation. For the analysis of cumulus cells, we used 8 different pools of cumulus cells retrieved from 20 immature, 10 *in vivo*-, and 10 *in vitro*-matured COCs, representing the same biological replicates. The total RNA was extracted using the TRIzol reagent (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) and the miRNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA was quantified using the NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) and the quality was estimated using the 260/280 ratio. Reverse transcription of mRNA was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Approximately 100 ng of the total RNA was incubated with 10x RT Buffer, 25x dNTP mix (100 mM), 10x RT Random Primers, and nuclease-free water at 25°C for 10 min and at 37°C for 120 min, followed by 5 min at 85°C to stop the reaction. For real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR), 10 ng of RNA at the initial concentration was used for each gene. RT-qPCRs were performed in duplicate using 1 µl of cDNA of each gene and 75 nM of primers using the Power SYBR® Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems) in the QuantStudio 6 Flex PCR System (Applied Biosystems). The PCR cycle conditions were as follows: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 60 s. The normalized Ct levels for FABP3 were obtained by the subtracting the Ct of the target gene using the geometric means of three reference genes (*PPIA*, *SDHA*, and *YWHAZ*). These endogenous genes have been demonstrated to be stably expressed and suitable for use as normalizers in gene expression studies of bovine oocytes⁴⁹. The primers were designed based on GenBank sequences (Supplementary Table S1) and tested for efficiency by running a standard curve; the specificity was confirmed by sequencing the amplicon.

Immunolocalization of FABP3 within TZPs and quantification of FABP3 levels and lipid content in oocytes during IVM. Through the *in vivo* and IVM studies, we aimed to understand FABP3 and lipid

behavior during IVM. First, we performed immunodetection of FABP3 in TZPs in immature and 9- and 18-h matured COCs in order to evaluate changes in the location of this protein. Subsequently, we studied FABP3 levels and the lipid content during IVM to understand the role of FABP3 in mediating fatty acid transport to oocytes. For these experiments, we collected grade I and II COCs from 3–6-mm follicles by postmortem follicular aspiration of bovine ovaries. The COCs had undergone IVM as described previously, and were then removed from the maturation media for analysis at 9 and 18 h after the beginning of IVM.

Immunodetection of FABP3 in TZPs within COC. FABP3 were detected in TZPs by immunofluorescence analysis after staining the actin filaments in order to visualize the TZPs. We stained immature COCs ($n = 12$), as well as COCs *in vitro*-matured for 9 ($n = 12$) and 18 h ($n = 15$). We also analyzed 10 denuded and 11 partial denuded oocytes submitted to IVM for 9 hours. The COCs assigned for immunodetection of FABP3 were obtained from three biological replicates. The COCs were fixed with 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffered saline (PBS) with 0.1% polyvinylpyrrolidone (PBS-PVP) for 12 minutes. COCs were then permeabilized for 20 min in PBS-PVP with 1% Triton X-100. After blocking of non-specific binding sites with 5% BSA in PBS for 1 h, COCs were incubated overnight at 4 °C with the primary rabbit antibody anti-FABP3 (1:200, SC15974R, Santa Cruz Biotechnology) and 1% BSA in PBS for FABP3 detection. Following incubation, the samples were washed in PBS-PVP and incubated with the secondary antibody, anti-rabbit conjugated with Alexa 488 (A11008, Life Technologies, Thermo Fisher) diluted at 1:200. After incubation, the samples were washed ten times in PBS-PVP to remove all non-specifically bound secondary antibodies. To label the TZPs, COCs were stained with 165 nM of Alexa Fluor 647 phalloidin (A22287, Life Technologies, Thermo Fisher), an actin filament stain, for 30 minutes. Oocytes were mounted on glass slides with coverslips using Prolong Antifade with DAPI reagent (Life Technologies, Thermo Fisher). For capturing images, a SP5 confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany) was used with Diode 405 nm, Argon 488 nm, and HeNe 633 nm adjusted to each probe. All images were captured by sequential acquisition, in 63x magnification in oil, and in 3.5x magnification for detecting TZPs. For the negative control, we omitted the incubation with primary antibody and acquired the images utilizing maximum laser potency to rule out the possibility of artifacts.

Confocal microscopic analysis of lipid content in oocytes. To evaluate a possible relationship between FABP3 transport and lipid accumulation in oocytes, we carried out a time course experiment on immature oocytes and oocytes *in vitro*-matured for 9 and 18 h. We collected a total of 27 immature oocytes, 31 oocytes after 9 h of IVM, and 28 oocytes after 18 h of IVM. We then quantified the lipid content in these oocytes as described in the previous section.

Quantification of FABP3 in oocytes by western blot. Western blot analyses were performed in 5 pools with 50 denuded oocytes from each group. The pools of oocytes were directly lysed in 7.5 μ L of RIPA buffer, mixed with 2.5 μ L Laemmli buffer (4x), boiled at 98 °C for 5 min, and then loaded onto a SDS-PAGE gel. All the other steps were performed as described in the previous sections.

Disruption of TZPs during IVM using cytochalasin B. To investigate the effects of blocking TZPs on lipid accumulation, we disrupted the TZPs during oocyte maturation using cytochalasin B, a potent fungal toxin that hampers actin polymerization. We treated the oocytes with cytochalasin B (15.7 μ M) in the maturation medium for 9 h in order to disrupt the TZPs. To observe the effects of TZP-disruption, we stained the actin filaments and FABP3 in 10 treated COCs and 10 untreated (control) COCs as described previously. This experiment was conducted in three biological replicates. The reduction in TZPs after cytochalasin B treatment was confirmed using an immunofluorescence analysis. Additionally, we quantified the lipid content using fluorimetric analysis of oocytes after 9 h of IVM in the presence ($n = 31$) and absence ($n = 31$) of cytochalasin B.

Statistical Analysis. The mRNA expression data were analyzed using the one-way ANOVA and the averages were compared using Tukey's test. The data from the western blot were subjected to logarithmic transformation before ANOVA and Tukey's test. These analyses were performed in SAS software. The lipid accumulation data were compared using the non-parametric Kruskal Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, and were performed using PRISM from Graphpad software. A 5% level of significance was adopted for all tests. Data were presented as mean $\pm$ standard error of the mean.

References

- Rizos, D., Ward, E., Duffy, P., Boland, M. P. & Lonergan, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development* **61**, 234–248, doi:10.1002/mrd.1153 (2002).
- Seidel, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* **65**, 228–235, doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.025 (2006).
- del Collado, M. *et al.* Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reproduction, fertility, and development* **28**, 1721, doi:10.1071/RD15067 (2016).
- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T. & Hoshi, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular reproduction and development* **61**, 57–66, doi:10.1002/mrd.1131 (2002).
- Rizos, D. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biology of Reproduction* **68**, 236–243, doi:10.1095/biolreprod.102.007799 (2002).
- Yang, X. *et al.* Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reproduction, fertility, and development* **22**, 1262–1271, doi:10.1071/RD10091 (2010).

7. Jungheim, E. S. *et al.* Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during *in vitro* fertilization. *Fertility and sterility* **95**, 1970–1974, doi:10.1016/j.fertnstert.2011.01.154 (2011).
8. Cardozo, E., Pavone, M. E. & Hirshfeld-Cytron, J. E. Metabolic syndrome and oocyte quality. *Trends Endocrin Metab* **22**, 103–109, doi:10.1016/j.tem.2010.12.002 (2011).
9. Robker, R. L. *et al.* Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. *J Clin Endocr Metab* **94**, 1533–1540, doi:10.1210/jc.2008-2648 (2009).
10. Robker, R. L., Wu, L. L. Y. & Yang, X. Inflammatory pathways linking obesity and ovarian dysfunction. *J Reprod Immunol* **88**, 142–148, doi:10.1016/j.jri.2011.01.008 (2011).
11. Yang, X. *et al.* Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. *Fertility and sterility* **97**, 1438–1443, doi:10.1016/j.fertnstert.2012.02.034 (2012).
12. Sutton, M. L. *et al.* Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* **126**, 27–34, doi:10.1530/rep.0.1260027 (2003).
13. Macaulay, A. D. *et al.* The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. *Biol Reprod* **91**, 90, doi:10.1095/biolreprod.114.119867 (2014).
14. Sutton, M. L., Gilchrist, R. B. & Thompson, J. G. Effects of *in-vivo* and *in-vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* **9**, 35–48, doi:10.1093/humupd/dmg009 (2003).
15. Lodde, V., Franciosi, F., Tessaro, I., Modina, S. C. & Luciano, A. M. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. *J Assist Reprod Gen* **30**, 1219–1226, doi:10.1007/s10815-013-0061-7 (2013).
16. Thomas, R. E., Armstrong, D. T. & Gilchrist, R. B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biology of Reproduction* **70**, 548–556, doi:10.1095/biolreprod.103.021204 (2004).
17. Hotamisligil, G. S. & Bernlohr, D. A. Metabolic functions of FABPs-mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* **11**, 592–605, doi:10.1038/nrendo.2015.122 (2015).
18. Ockner, R. K. Fatty-Acid Binding-Proteins - Considerable Progress - More Ground to Cover - A Citation-Classic Commentary on a Binding-Protein for Fatty-Acids in Cytosol of Intestinal-Mucosa, Liver, Myocardium, and Other Tissues by Ockner, R. K., Manning, J. A., Poppenhausen, R. B. & Ho, W. K. L. *Cc/Life Sci*, 9–9 (1991).
19. Ockner, R. K. & Manning, J. A. Fatty Acid-Binding Protein in Small-Intestine - Identification, Isolation, and Evidence for Its Role in Cellular Fatty-Acid Transport. *J Clin Invest* **54**, 326–338, doi:10.1172/jci107768 (1974).
20. Furuhashi, M. & Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 489–503, doi:10.1038/nrd2589 (2008).
21. Hertz, A. V. & Bernlohr, D. A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 175–180, doi:10.1016/S1043-2760(00)00257-5 (2000).
22. Sanchez-Lazo, L. *et al.* Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Molecular endocrinology* **28**, 1502–1521, doi:10.1210/me.2014-1049 (2014).
23. Ferguson, E. M. & Leese, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of reproduction and fertility* **116**, 373–378, doi:10.1530/jrf.0.1160373 (1999).
24. de Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P. & Kruip, T. A. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* **24**, 197–204, doi:10.1002/mrd.1120240207 (1989).
25. de Loos, F., Kastrop, P., Van Maurik, P., Van Beneden, T. H. & Kruip, T. A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular reproduction and development* **28**, 255–259, doi:10.1002/mrd.1080280307 (1991).
26. Kruip, T. A. M., Cran, D. G., Vanbeneden, T. H. & Dieleman, S. J. Structural-Changes in Bovine Oocytes during Final Maturation *In vivo*. *Gamete Res* **8**, 29–47, doi:10.1002/mrd.1120080105 (1983).
27. Simon, A. M. & Goodenough, D. A. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* **8**, 477–483, doi:10.1016/S0962-8924(98)01372-5 (1998).
28. Albertini, D. F., Combelles, C. M., Benecchi, E. & Carabatsos, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* **121**, 647–653, doi:10.1530/rep.0.1210647 (2001).
29. Macaulay, A. D. *et al.* Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. *Biol Reprod* **94**, 16, doi:10.1095/biolreprod.114.127571 (2016).
30. Subra, C. *et al.* Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research* **51**, 2105–2120, doi:10.1194/jlr.M003657 (2010).
31. Hurwitz, S. N. *et al.* Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers. *Oncotarget* **7**, 86999–87015, doi:10.18632/oncotarget.13569 (2016).
32. Fujita, K. *et al.* Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep* **7**, 42961, doi:10.1038/srep42961 (2017).
33. Kralisch, S. *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int J Obesity* **38**, 1251–1254, doi:10.1038/ijo.2013.232 (2014).
34. Kalra, H. *et al.* Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* **10**, e1001450, doi:10.1371/journal.pbio.1001450 (2012).
35. Iso, T. *et al.* Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 2549–2557, doi:10.1161/ATVBAHA.113.301588 (2013).
36. Diaz, P., Harris, J., Rosario, F. J., Powell, T. L. & Jansson, T. Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy. *Am J Physiol-Reg I* **309**, R1569–R1577, doi:10.1152/ajpregu.00385.2015 (2015).
37. Zhang, Y. *et al.* Fatty acid binding protein 3 (fabp3) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications in a northern european family population. *Bmc Med Genomics* **6**, doi:Artn 910.1186/1755-8794-6-9 (2013).
38. Karakas, S. E., Almaro, R. U. & Kim, K. Serum fatty acid binding protein 4, free fatty acids, and metabolic risk markers. *Metabolism* **58**, 1002–1007, doi:10.1016/j.metabol.2009.02.024 (2009).
39. Haider, D. G. *et al.* Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab* **9**, 761a–763, doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00717.x (2007).
40. Haluzik, M. M. *et al.* Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment. *Physiol Res* **58**, 93–99 (2009).
41. Krzystek-Korpacka, M. *et al.* Circulating adipocyte fatty acid-binding protein, juvenile obesity, and metabolic syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* **24**, 921–928, doi:10.1515/JPEM.2011.323 (2011).
42. Charlier, C. *et al.* Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution. *Bmc Genomics* **13**, 560, doi:10.1186/1471-2164-13-560 (2012).
43. Zanotti, G. Muscle fatty acid-binding protein. *Bba-Mol Cell Biol I* **1441**, 94–105, doi:10.1016/S1388-1981(99)00163-8 (1999).
44. Veerkamp, J. H. & Vanmoerkerk, H. T. B. Fatty-Acid-Binding Protein and Its Relation to Fatty-Acid Oxidation. *Mol Cell Biochem* **123**, 101–106, doi:10.1007/B01076480 (1993).

45. Aardema, H. *et al.* Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol Reprod* **88**, 164–164, doi:10.1095/biolreprod.112.106062 (2013).
46. Akbal, E. *et al.* Serum heart type fatty acid binding protein levels in metabolic syndrome. *Endocrine* **36**, 433–437, doi:10.1007/s12020-009-9243-6 (2009).
47. Bickel, P. E., Tansey, J. T. & Welte, M. A. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et biophysica acta* **1791**, 419–440, doi:10.1016/j.bbalip.2009.04.002 (2009).
48. Sastre, D. *et al.* Expression of PLIN2 and PLIN3 during oocyte maturation and early embryo development in cattle. *Theriogenology* **81**, 326–331, doi:10.1016/j.theriogenology.2013.10.002 (2014).
49. Macabelli, C. H. *et al.* Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. *PLoS one* **9**, e93287, doi:10.1371/journal.pone.0093287 (2014).

Acknowledgements

The authors would like to thank the LMMD staff and students for the dedicated work during samples collections and laboratory procedures. The authors are also thankful to Elizabete Rosa Milani from FMRP-USP for technical assistance during acquisition of confocal microscopy images. This work was supported by grants from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP grant 2014/21034-3; grant 2014/03281-3; grant 2014/22887-0; grant 2015/26056-8 and grant 2013/08135-2) and the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

M.C., J.C.S., F.V.M., L.A.S. and F.P. designed the study; M.C., J.C.S. and G.M.A. collected the samples; M.C., J.R.S., L.R.S.S. performed the experiments; M.C., J.C.S. and F.P. analysed the data; M.C., J.C.S., and F.P. wrote the manuscript. All the authors discussed the results and reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02467-9

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017