UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA CLARA FAQUINELI CAVALCANTE MENDES DE ÁVILA

Efeitos da comunicação entre células do sistema reprodutivo feminino e oócitos bovinos mediada por vesículas extracelulares de diferentes estágios do ciclo estral

Pirassununga
2019

ANA CLARA FAQUINELI CAVALCANTE MENDES DE ÁVILA

Efeitos da comunicação entre células do sistema reprodutivo feminino e oócitos bovinos mediada por vesículas extracelulares de diferentes estágios do ciclo estral

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira

Pirassununga

2019

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

d278e de Ávila, Ana Clara Faquineli Cavalcante Mendes
Efeitos da comunicação entre células do sistema reprodutivo feminino e oócitos bovinos mediada por vesículas extracelulares de diferentes estágios do ciclo estral / Ana Clara Faquineli Cavalcante Mendes de Ávila ; orientador Juliano Coelho da Silveira. -- Pirassununga, 2019.
194 f.

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

1. Reprodução animal. 2. Bovinos. 3. Folículo ovariano. 4. Vesículas extracelulares. 5. miRNAs. I. da Silveira, Juliano Coelho, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

ANA CLARA FAQUINELI CAVALCANTE MENDES DE ÁVILA

Efeitos da comunicação entre células do sistema reprodutivo feminino e oócitos bovinos mediada por vesículas extracelulares de diferentes estágios do ciclo estral

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data de aprovação: 04/09/2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira – Presidente da Banca Examinadora
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA- USP

Profa. Dra. Anna Carolina Denicol
University of California, Davis campus

Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba- FMVA- UNESP

Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP- USP

Aos meus pais, Fábio e Heloisa, e a todos os profissionais que se dedicam à reprodução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, **Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira**, pela dedicação a este trabalho, por todos os ensinamentos, pelas oportunidades, pela amizade e apoio durante estes três anos de mestrado. Ao **Prof. Dr. Felipe Perecin** por abrir as portas do laboratório e por todos os ensinamentos. Agradeço também aos professores **Dr. Flávio Vieira Meirelles**, **Dr. Luciano Andrade**, **Dra. Fabiana Bressan** e **Dra. Cláudia Leal** pela colaboração. À **Dra. Cibele Prado** pela dedicação e disposição em nos ajudar. Ao **Prof. Dr. Claude Robert**, **Alexandre Bastien**, **Dra. Isabelle Gilbert** e **Isabelle Laflamme** pela oportunidade de intercâmbio e colaboração.

Agradeço à **Universidade de São Paulo**, à **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos** e à **Université Laval** pela estrutura e apoio dos funcionários. Ao **laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica** e de **Microscopia Confocal**, ao **Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática**, situados na FMRP-USP, e ao **Laboratório de Biotecnologia Animal**, situado na ESALQ-USP, pela colaboração com as análises realizadas neste estudo. Agradeço também aos **abatedouros Olhos d'água** (Ipuã-MG) e **Vale do Prata** (São João da Boa vista-SP), pela doação dos ovários e à **CRV Lagoa da Serra** pela doação do sêmen.

À **CAPES** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (**FAPESP**; processos número: 2017/02037-0; 2018/14869-2; 2014/22887-0 e 2015/21829-9), pela concessão da bolsa de mestrado, pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço aos meus pais, **Fábio e Heloisa**, pelo exemplo de profissionalismo, caráter, por todo apoio e amor incondicional. Ao meu irmão, **João Victor** e ao **Lucas** pelo carinho, paciência e companheirismo. Aos meus **avós, tios, Rê e Malu** por toda preocupação e amor. Aos meus **amigos**, Andréia, Paula, Dani, Lu e Pedro, que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus **amigos de laboratório**, Gabriella, Alessandra, Maite, Monalisa, Marina, Juliano, Rafael, Tiago, Ricardo, Jorge, Julio, Rosane, Natália, Taismara, Ramon, Naira, Aline, Raquel, Lucas, Kelly, Maíra, Hugo, Letícia, Jéssica, Dewison, Victória Barillari, Victória Sanchez, João e Léo, agradeço pela convivência, todos os ensinamentos e momentos de alegria.

RESUMO

DE ÁVILA, A.C.F.C.M. **Efeitos da comunicação entre células do sistema reprodutivo feminino e oócitos bovinos mediada por vesículas extracelulares de diferentes estágios do ciclo estral.** 2019. 194 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

As técnicas de reprodução assistida (TRA) são alternativas para infertilidade e aumento da produção de animais de interesse. Apesar de amplamente utilizadas, as TRA podem causar consequências negativas aos indivíduos gerados desde o estabelecimento da gestação até a vida adulta. A tentativa de mimetizar o ambiente *in vivo* é uma opção para aprimorar as TRA. Vesículas extracelulares (VEs) secretadas por células são alvos de estudos recentes devido suas funções de comunicação intercelular no ambiente *in vivo*. As VEs são encontradas em fluidos corporais e possuem material bioativo, como miRNAs, que regulam o funcionamento de células a partir da modulação pós-transcricional. A hipótese deste estudo é que VEs pequenas secretadas por células foliculares e células do oviduto favoreçam a maturação e a fertilização *in vitro* de complexos cumulus-oócitos (CCOs). O objetivo do estudo foi caracterizar e avaliar os efeitos de VEs do fluido folicular (FF) e do oviduto obtidos em diferentes momentos do ciclo estral de bovinos durante a produção *in vitro*. Para isso, VEs foram isoladas de FF e do lavado de oviduto bovino, caracterizadas e utilizadas como suplementação durante a maturação e a fertilização *in vitro*, respectivamente. Os resultados demonstraram que as VEs do fluido de folículos em diferentes momentos do ciclo estral possuem diferentes perfis de miRNAs. A suplementação com VEs pequenas de FF durante a maturação *in vitro* (MIV) causou a internalização dessas VEs e do seu RNA pelos CCOs, mas não afetou as taxas de blastocistos. Porém, foi demonstrado que as VEs de diferentes origens foliculares modulam vias como PI3K-Akt e de transporte de RNA e processos biológicos relacionados à maturação oocitária, à ovulação e à resposta imune em células do cumulus. As VEs obtidas do oviduto em diferentes momentos do ciclo estral não afetaram as taxas de produção e a qualidade de blastocistos no modelo utilizado. Em conclusão, este estudo demonstrou que as VEs pequenas são modificadas de acordo com sua origem folicular e que impactam processos biológicos em células do cumulus de bovinos.
Palavras-chave: Bovinos. MicroRNAs. Fluido folicular. Oviduto. Vesículas extracelulares.

ABSTRACT

DE ÁVILA, A.C.F.C.M. **The effects of communication between female reproductive system cells and bovine oocytes mediated by extracellular vesicles of different estrous cycle stages.** 2019. 194f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Assisted reproductive techniques (ART) are alternatives to infertility and to increase animals' production. Although these techniques are widely used, they can cause negative consequences since early pregnancy until adult life. Attempts to mimic *in vivo* environment are applied to improve ARTs. Extracellular vesicles (EVs) secreted by cells are targets of recent studies due to their function in intercellular communication. These vesicles are in body fluids and have bioactive material, as miRNAs, that regulate cell functions by post-transcriptional modulation. The hypothesis of this study is that small EVs secreted by follicular and oviductal cells improve the *in vitro* maturation and fertilization of cumulus-oocyte complexes (COCs). Our goal was to characterize and to evaluate the effects of small EVs from follicular and oviductal fluids obtained from different bovine estrous cycle stages during *in vitro* embryo production. For this, EVs were isolated from bovine follicular fluid (FF) and oviductal flushing, characterized and used as supplementation during *in vitro* maturation and fertilization, respectively. The results demonstrated that small EVs from follicles at different estrous cycle stage have different miRNA profile. The small EVs from FF and their RNA were taken up by COCs during *in vitro* maturation but did not change blastocyst production rates. However, we demonstrated that small EVs from different follicle origin modulate pathways such as PI3K-Akt and RNA transport and biological processes related to oocyte maturation, ovulation and immune responses in cumulus cells. Small EVs from oviduct at different estrous cycle stage did not improve embryo production rates and embryo quality in our model. Therefore, this study demonstrated that small EVs are modified according to their follicular origin and are able to impact biological processes in bovine cumulus cells.

Keywords: Bovine. Extracellular vesicles. Follicular fluid. MicroRNAs. Oviduct.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Demonstração dos tipos de comunicações intercelulares entre células foliculares e oócito. ----------22
Figura 2- Representação dos mecanismos de comunicação entre VEs e células alvo. ----------31
Figura 3- Representação da participação de VEs pequenas na comunicação intercelular no ambiente reprodutivo de fêmeas, como (I) no ovário, (II) no oviduto e (III) no útero. ----------32
Figura 4 – Representação esquemática dos processos envolvidos na biossíntese de miRNAs. ----------38
Figura 5 – Imagens representando a classificação dos estágios do ciclo estral de acordo com a aparência do corpo lúteo. ----------46
Figura 6 – Fluxograma referente ao estudo 1 demonstrando o processamento do fluido folicular e caracterização de VEs pequenas. ----------46
Figura 7 – Fluxograma representando experimentos do estudo 2, utilizando a suplementação de VEs durante a maturação *in vitro* para avaliação da sua internalização por complexo cumulus-oócitos e seus efeitos em taxas de produção de embriões *in* vitro. ----------48
Figura 8 - Fluxograma representando experimentos do estudo 3, utilizando a suplementação de VEs durante a maturação *in vitro* para quantificação de RNA em células do cumulus, zona pelúcida e oócitos. ----------50
Figura 9 – Fluxograma representando os experimentos do estudo 4 baseado na suplementação de VEs pequenas oriundas de folículos expostos à baixa e à alta concentração de P4 e as análises realizadas para avaliação de possíveis modificações transcricionais após 9 e 24 horas de maturação *in vitro*. ----------53
Figura 10 – Fluxograma representando os experimentos do estudo 5, utilizando VEs do oviduto durante a fertilização *in vitro*. ----------55
Figura 11 – Figura esquemática representando o protocolo de centrifugações seriadas para preparo de fluidos para posterior isolamento de VEs pequenas. ----------58
Figura 12 - Dosagem de estradiol e progesterona em fluido folicular de diferentes estágios do ciclo estral bovino. ----------76
Figura 13 - Caracterização do *pellet* enriquecido de VEs pequenas a partir do isolamento de fluido folicular. ----------77

Figura 14 - Diagrama de *Venn* representando o número de miRNAs maduros presentes em VEs obtidas do fluido de folículos expostos à baixa e à alta concentração de progesterona. ----------78
Figura 15 - Diagrama de *Venn* representando o número de miRNAs precursores e maduros presentes em VEs obtidas do fluido de folículos expostos à baixa e alta concentração de progesterona. ----------79
Figura 16 - Representação das vias reguladas por miRNAs maduros elevados em VEs pequenas do fluido de folículos sob alta P4 em comparação aos folículos sob baixa P4. ----------80
Figura 17 - Representação de 20 vias reguladas por miRNAs precursores e maduros presentes elevados em VEs do fluido folicular do grupo baixa P4 em comparação ao grupo alta P4. ----------82
Figura 18 – Imagens ao vivo (*live cell imaging)* da internalização de VEs pequenas durante a primeira hora de maturação *in vitro*. ----------85
Figura 19 – Imagens representativas de vídeo em tempo real demonstrando a interação entre VEs pequenas e CCOs durante a maturação *in vitro*. ----------86
Figura 20 – Imagens representativas de vídeo em tempo real demonstrando a proximidade de VEs pequenas ao início da TZP. ----------87
Figura 21 – Imagens de CCOs fixados após 4 e 9 horas de maturação *in vitro* demonstrando a localização de VEs pequenas próximas às TZPs. ----------88
Figura 22- Imagens representativas de vídeo ao vivo demonstrando a presença de VEs pequenas localizadas no ooplasma e em projeções entre células. ----------89
Figura 23 – Complexos cumulus-oócitos fixados após 18 a 22 horas de maturação *in vitro*. ----------89
Figura 24- Representação gráfica das taxas de maturação e de produção *in vitro* de embriões após tratamento de VEs pequenas de fluido de folículos sob baixa e alta P4 no meio de maturação. ----------90
Figura 25 – Representação de imagens em tempo real durante a maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócitos suplementados com VEs pequenas cujo RNA foi corado. ----------92
Figura 26 - Imagens representativas de oócitos desnudos utilizados para quantificação de moléculas de RNA na região da zona pelúcida. ----------93

Figura 27 – Representação gráfica demonstrando a média dos pontos de RNA quantificados na região da zona pelúcida de oócitos imaturos ou maturados durante 2 e 4 horas na ausência ou presença de VEs pequenas. ----------94
Figura 28 – Figura representando a quantidade de RNA total em grupos de oócitos desnudos maduros ao final da maturação *in vitro*. ----------95
Figura 29 – Representação gráfica da expressão relativa de transcritos da via PI3K-Akt e de transporte de RNA em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro*. ----------97
Figura 30 – Representação gráfica da expressão relativa de transcritos da via PI3K-Akt e de transporte de RNA em células do cumulus após 24 horas de maturação *in vitro*. ----------98
Figura 31- Representação da quantificação da proteína PTEN em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro* suplementada com SFB sem VEs ou VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4. ----------99
Figura 32 – Diagrama de Venn representando o perfil de miRNAs maduros encontrado em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro* com suplementação apenas de SFB sem VEs ou com VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4. ----------101
Figura 33 – Representação gráfica dos miRNAs maduros diferentes entre células do cumulus expostas a diferentes suplementações que possuem *PTEN* e *EIF4E* como preditivos alvos e expressão relativa inversa aos seus alvos. ----------101
Figura 34 – Análise de componentes principais dos grupos de células do cumulus suplementadas apenas com SFB sem VEs ou com VEs pequenas dos grupos baixa ou alta P4 durante 9 horas de maturação *in vitro.* ----------102
Figura 35 – Gráficos *Volcano plot* representando os genes diferencialmente expressos em células do cumulus que foram suplementadas com SFB sem VEs ou VEs pequenas dos grupos baixa ou alta P4 durante 9 horas de maturação *in vitro*. ------103
Figura 36- Representação simplificada da via de sinalização PI3K-Akt e as modulações de seus componentes em células do cumulus após as diferentes suplementações durante a maturação in vitro. ----------105
Figura 37 – Representação da análise de enriquecimento funcional de vias biológicas em células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs apenas ou VEs pequenas de folículos sob alta ou baixa P4. ----------106
Figura 38- Ontologia gênica comparativa entre células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs ou VEs pequenas de folículos sob alta ou baixa P4. ----------107

Figura 39 – Caracterização de vesículas extracelulares pequenas obtidas do lavado de oviduto bovino. ----------109
Figura 40 – Representação gráfica das taxas de produção de embriões *in vitro* após suplementação com VEs pequenas oriundas de ovidutos em diferentes momentos do ciclo estral na etapa de fertilização. ----------110
Figura 41 – Representação gráfica da expressão relativa de transcritos relacionados à qualidade embrionária em embriões do dia 7 de cultivo *in vitro* submetidos à suplementação de VEs pequenas durante a fertilização *in vitro*. ----------112
Figura 42- Modelo hipotético gráfico representando o efeito da suplementação de VEs pequenas no CCO durante a maturação *in vitro*. ----------133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação das médias de taxa de maturação, taxa de clivagem e taxa de produção de blastocistos após tratamento de CCOs com VEs do fluido de folículos expostos à baixa e à alta concentração de P4 em meios de maturação. ----------91
Tabela 2 – Detalhamento do número de oócitos analisados por grupo experimental e a média e desvio padrão do RNA quantificado em cada grupo. ----------94
Tabela 3 - Representação das médias de taxa de fertilização, taxa de clivagem e taxa de produção de blastocistos após tratamento de CCOs e espermatozoides com VEs do oviduto em diferentes momentos do ciclo estral durante a fertilização *in vitro*. ---110

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ----------16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ----------19
2.1 O desenvolvimento folicular ovariano e oocitário ----------19
2.2 Modificações fisiológicas do folículo ovariano ----------22
2.3 A Influência da progesterona no folículo ovariano e oócito ----------24
2.4 Os impactos das técnicas de reprodução assistida na competência oocitária e embrionária ----------27
2.5 Caracterização das vesículas extracelulares ----------29
2.6 Vesículas extracelulares na reprodução de fêmeas ----------31
2.7 MicroRNAs ----------36
2.8 Avanços e perspectivas do uso de vesículas extracelulares ----------40
3 HIPÓTESES, OBJETIVOS, JUSTIFICATIVAS E DESENHO EXPERIMENTAL ------- 44
3.1 Estudo 1: Caracterização de vesículas extracelulares pequenas oriundas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral bovino ----------44
3.2 Estudo 2: O uso de vesículas extracelulares pequenas como suplementação na maturação in vitro de complexos cumulus-oócitos bovinos ----------46
3.3 Estudo 3: O impacto da suplementação de vesículas extracelulares pequenas no transporte de RNA em complexos cumulus-oócitos bovinos durante a maturação in vitro- ----------49
3.4 Estudo 4: Modificações transcricionais em células do cumulus de oócitos bovinos causadas pela suplementação de vesículas extracelulares pequenas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral ----------51
3.5 Estudo 5: Caracterização e uso de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino na suplementação de complexos cumulus-oócitos e espermatozoides durante a fertilização in vitro ----------53
4 MATERIAL E MÉTODOS ----------56
4.1 Local de desenvolvimento do projeto e reagentes ----------56
4.2 Estudo 1 ----------57
4.2.1 Coleta de fluido folicular para obtenção de vesículas extracelulares ----------57
4.2.2 Dosagem de estradiol e progesterona do fluido folicular ----------57
4.2.3 Isolamento de vesículas extracelulares pequenas ----------57
4.2.4 Caracterização das vesículas extracelulares pequenas ----------58

4.2.5 Extração de RNAs de vesículas extracelulares pequenas e transcrição reversa ----------60
4.2.6 Análises de expressão relativa dos miRNAs por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time – PCR) ----------61
4.2.7 Análises de miRNAs maduros e precursores ----------61
4.3 Estudo 2 ----------62
4.3.1 Coloração de vesículas extracelulares pequenas e suplementação do meio de maturação in vitro ----------62
4.3.2 Análise da internalização de vesículas extracelulares pequenas por complexos cumulus-oócitos durante a maturação in vitro ----------62
4.3.3 Produção in vitro de embriões bovinos ----------63
4.4 Estudo 3 ----------65
4.4.1 Coloração do RNA de vesículas extracelulares pequenas do fluido folicular e avaliação da internalização por células do cumulus ----------65
4.4.2. Coloração e quantificação do RNA total na zona pelúcida de oócitos ---------66
4.4.3 Quantificação do RNA total em oócitos desnudos ----------67
4.5 Estudo 4 ----------67
4.5.1 Coleta de células do cumulus ----------67
4.5.2 Extração de RNA de células do cumulus e transcrição reversa ----------68
4.5.3 Análises de expressão relativa dos RNAm e miRNAs por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time – PCR) ----------68
4.5.4 Abundância da proteína PTEN em células do cumulus ----------69
4.5.5 Sequenciamento de RNA de células do cumulus ----------70
4.6 Estudo 5 ----------71
4.6.1 Coleta de lavado do oviduto e caracterização de vesículas extracelulares pequenas ----------71
4.6.2 Produção in vitro de embriões bovinos ----------72
4.6.3 Extração de RNA e transcrição reversa de embriões ----------73
4.6.4 Análises de expressão relativa de RNAm por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time – PCR) ----------73
4.7 Análises estatísticas ----------74
5 RESULTADOS ----------75
5.1 Estudo 1 ----------75
5.1.1 Dosagem hormonal de fluido de folículos em diferentes estágios do ciclo estral ----------75

5.1.2 Caracterização de vesículas extracelulares pequenas de fluido folicular ------76
5.1.3 Perfil de miRNAs em vesículas extracelulares pequenas ----------77
5.1.4 Vias biológicas reguladas por miRNAs presentes em vesículas extracelulares pequenas de fluido folicular em diferentes estágios do ciclo estral bovino ----------79
5.2 Estudo 2 ----------84
5.2.1 Avaliação da internalização de vesículas extracelulares pequenas por complexos cumulus-oócitos durante a maturação in vitro ----------84
5.2.2 Efeito de vesículas extracelulares pequenas oriundas de fluido de folículos sob baixa e alta P4 nas taxas de maturação de CCOs e de produção in vitro de embriões bovinos ----------90
5.3 Estudo 3 ----------91
5.3.1 Internalização do RNA de vesículas extracelulares pequenas em células do cumulus após suplementação de complexos cumulus-oócitos ----------91
5.3.2 Quantificação de moléculas de RNA na zona pelúcida de oócitos após suplementação com vesículas extracelulares pequenas ----------92
5.3.3 Quantificação do RNA total em oócitos desnudos após suplementação com vesículas extracelulares pequenas ----------94
5.4 Estudo 4 ----------95
5.4.1 Expressão relativa de transcritos da via de sinalização PI3K-Akt e da via de transporte de RNA em células do cumulus ----------95
5.4.2. Quantificação da proteína PTEN em células do cumulus após diferentes suplementações durante a maturação in vitro ----------99
5.4.3 O perfil de miRNAs em células do cumulus após suplementação com vesículas extracelulares pequenas ----------100
5.4.4 O perfil de RNAs em células do cumulus após suplementação com vesículas extracelulares pequenas ----------102
5.5 Estudo 5 ----------108
5.5.1 Caracterização de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino ---108
5.5.2 Efeito de vesículas extracelulares pequenas oriundas de ovidutos em estágio pós-ovulatório e em meio de ciclo estral na fertilização de CCOs e produção in vitro de embriões bovinos ----------109
5.5.3 Avaliação da expressão relativa de transcritos relacionados à qualidade embrionária ----------111

6 DISCUSSÃO ---------- 113

6.1 Estudo 1 ----------113

6.2 Estudo 2 ----------119

6.3 Estudo 3 ----------122

6.4 Estudo 4 ----------124

6.5 Estudo 5 ----------133

7 CONCLUSÕES ----------137

7.1 Estudo 1 ----------137

7.2 Estudo 2 ----------137

7.3 Estudo 3 ----------138

7.4 Estudo 4 ----------138

7.5 Estudo 5 ----------140

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS--------141

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS----------142

APÊNDICE ----------158

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (TRA) têm sido amplamente utilizadas em humanos e animais como alternativas para problemas de infertilidade e como ferramentas para aumentar a eficiência produtiva de animais de interesse pecuário, principalmente em bovinos. Entretanto, as manipulações de gametas e embriões *in vitro* são capazes de causar modificações epigenéticas e em níveis de expressão de transcritos durante processos de maturação de gametas e desenvolvimento de embriões, o que têm causado consequências negativas como perdas embrionárias e distúrbios metabólicos nos indivíduos gerados por estas biotécnicas (BOUILLON et al., 2016; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

A eficiência de produção e qualidade de embriões produzidos *in vivo* é superior aos embriões produzidos *in vitro* (RIZOS et al., 2002a). Sendo assim, acredita-se que grande parte do sucesso da produção *in vitro* depende do ambiente que mimetize os mecanismos *in vivo*, afinal, o desenvolvimento de gestações e de indivíduos saudáveis dependem de gametas e de embriões que previamente passaram por mecanismos fisiológicos orquestrados, os quais dão suporte à competência oocitária e embrionária.

Ao longo do desenvolvimento das TRA, muito estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de aprimorar estas biotécnicas visando melhor competência oocitária e um ambiente mais adequado para o desenvolvimento inicial dos embriões. As vesículas extracelulares (VEs) tornaram-se alvos desses estudos principalmente após evidências de que são secretadas por diversas células, são encontradas em fluidos corporais e possuem material bioativo como RNAm,

microRNAs (miRNAs), proteínas e lipídios, os quais modulam o funcionamento de células alvo em situações fisiológicas e patológicas.

As VEs foram classificadas em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos de acordo com a biogênese e funções (GYÖRGY et al., 2011). No cenário atual, estas vesículas estão sendo muito exploradas como importantes mediadoras de comunicação intercelular podendo ser utilizadas como biomarcadores e veículos de moléculas de interesse para o favorecimento de processos biológicos. Entre as moléculas carregadas por VEs estão os miRNAs, que são pequenas sequências de RNAs de aproximadamente 20 nucleotídeos conceituados como reguladores pós-transcricionais, capazes de inibir a tradução ou degradar transcritos (BARTEL, 2018). Os miRNAs carreados por VEs ou livres têm sido muito estudados recentemente, afinal um único miRNA pode modular diversos transcritos que estão envolvidos em vias biológicas essenciais em processos reprodutivos, por exemplo.

A comunicação entre VEs secretadas por células do trato reprodutivo de mamíferos, gametas e embriões já foi comprovada e demostrou efeitos positivos para reprodução. Sabe-se que VEs do FF são internalizadas por células da granulosa e por complexos cumulus-oócitos (CCOs), e que VEs secretadas pelo oviduto são internalizadas por embriões. Além disso, o conteúdo destas VEs foi associado a efeitos na maturação de CCOs e no desenvolvimento embrionário. Estes efeitos são continuamente investigados e utilizados como ferramenta para favorecer a utilização das VEs como moduladores de processos reprodutivos.

Sendo assim, este estudo tem o objetivo de caracterizar VEs de fluido de folículos e ovidutos obtidos em diferentes momentos do ciclo estral e avaliar seus efeitos após suplementação durante etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). No primeiro estudo as VEs pequenas de fluido de folículos em início e meio

de ciclo estral, associados a baixas e altas concentrações de progesterona (P4), foram caracterizadas e foi avaliado o perfil de miRNAs destas VEs. No segundo estudo foram avaliadas a internalização de VEs pequenas por CCOs e seus efeitos na PIVE. Já no terceiro estudo foi avaliado o efeito da suplementação de VEs no transporte de RNA em diferentes compartimentos dos CCOs. Por fim, foram avaliadas as modificações transcricionais em células do cumulus após suplementação com VEs pequenas do fluido de folículos de diferentes momentos do ciclo estral. De forma complementar, VEs pequenas do lavado do oviduto bovino foram caracterizadas e utilizadas na etapa de fertilização *in vitro* de CCOs bovinos e a expressão relativa de transcritos marcadores de qualidade foi avaliada nos embriões produzidos *in vitro*.

Por fim, este estudo foi realizado para caracterizar VEs pequenas obtidas de diferentes ambientes foliculares e do oviduto e para avaliar seus impactos no sistema de PIVE de bovinos. O estudo justifica-se pela necessidade de esclarecer mecanismos moleculares fisiológicos de comunicação entre células do sistema reprodutivo e gametas que favoreçam as TRA. Este estudo tem potencial em contribuir com o sistema de PIVE de bovinos, bem como é um importante modelo de estudos para as TRAs em humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O desenvolvimento folicular ovariano e oocitário

O folículo ovariano é uma das principais estruturas do ovário e representa o ambiente onde oócitos, os gametas femininos, são desenvolvidos. O ambiente folicular antral é constituído por três tipos celulares somáticos, sendo eles as células da teca interna e externa, células da granulosa murais e células do cumulus (KNIGHT; GLISTER, 2006). Ao longo de seu desenvolvimento, o folículo ovariano é regulado por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos (MATSUDA et al., 2012) os quais influenciam o crescimento folicular e a competência oocitária.

A formação folicular inicia-se durante o desenvolvimento fetal (SCARAMUZZI et al., 2011) a partir das PGCs (*primordial germ cells*), que colonizam as gônadas primitivas (MOLYNEAUX et al., 2001). O primeiro estágio do desenvolvimento folicular é representado pelo folículo primordial, presente em fetos bovinos desde aproximadamente 90 dias de gestação, quando o oócito (~30µm), sem zona pelúcida e na fase de prófase I da meiose, está rodeado por células da granulosa escamosas (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; FORTUNE; YANG; MURUVI, 2010; TOWNSON; COMBELLES, 2012; YANG; FORTUNE, 2008). A partir de então, os folículos passam por fases de crescimento e atresia desde a vida fetal até a fase adulta (SCARAMUZZI et al., 2011). Os folículos tornam-se primários em fetos bovinos de aproximadamente 140 dias de gestação, os quais possuem uma camada de células da granulosa cuboide e oócito entre 25 a 45 µm (TOWNSON; COMBELLES, 2012; YANG; FORTUNE, 2008). Em fetos bovinos com mais de 210 dias de gestação há presença de folículos secundários (pré-antrais), os quais possuem duas ou mais camadas de células da granulosa em torno do oócito (35-70µm), células da teca interna e formação da zona pelúcida (SCARAMUZZI et al., 2011; TOWNSON; COMBELLES, 2012; YANG; FORTUNE, 2008).

Aos 230 dias de gestação, há formação dos primeiros folículos terciários em bovinos (HYTTEL, 2010). Os folículos terciários (antrais) são caracterizados por inúmeras transformações estruturais e principal regulação por hormônios do eixo-hipotálamo-hipofisário a partir da puberdade (TOWNSON; COMBELLES, 2012). Nesta fase da foliculogênese ocorre a formação de uma única cavidade folicular,

denominada antro, com presença do FF (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009). Esta cavidade separa as populações celulares, formando as células da granulosa murais, essenciais para esteroidogênese e ovulação, e as células do cumulus que circundam o oócito (100-150μm) e estão envolvidas no desenvolvimento da competência oocitária (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008; SCARAMUZZI et al., 2011; TOWNSON; COMBELLES, 2012).

Durante o desenvolvimento folicular, o oócito cresce e adquire competência, o que indica que estará apto a finalizar a maturação, ser fertilizado, gerar um embrião viável e um indivíduo saudável (READER; STANTON; JUENGEL, 2017; SIRARD et al., 2006; WATSON, 2007). A competência oocitária envolve as modificações do oócito que ocorrem no ambiente folicular por meio de processos que podem ser nominados de “capacitação oocitária” (HYTTEL et al., 1997). Estes processos incluem a adequada maturação meiótica, citoplasmática e molecular (SIRARD et al., 2006).

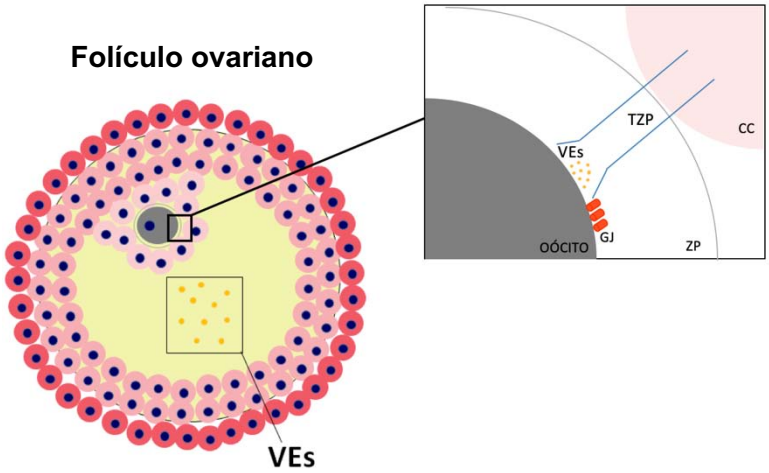
A maturação meiótica é definida pela progressão do ciclo meiótico oocitário. O oócito mantido em prófase I da meiose reinicia a meiose, atingindo o estágio de metáfase II, após o pico de LH ou punção do folículo ovariano (ADHIKARI; LIU, 2014; CONTI et al., 2012). O bloqueio e recomeço da meiose é mediado pela sinalização entre as células somáticas foliculares e o oócito, regulado por alteração de níveis de mensageiros como o AMPc (CLARKE, 2017; LUCIANO et al., 2011a; TSAFRIRI et al., 1996).

Ao mesmo tempo, a maturação citoplasmática, caracterizada pelas modificações da distribuição, morfologia e propriedades bioquímica de organelas e acúmulo de RNAs, proteínas, substratos e nutrientes no citoplasma, tem grande impacto durante a fertilização e desenvolvimento embrionário (MAO et al., 2014; READER; STANTON; JUENGEL, 2017; WATSON, 2007). Estas modificações são essenciais para dar suporte ao início do desenvolvimento embrionário durante o período de transição materno-embrionária, visto que até o momento da ativação do genoma embrionário, majoritariamente entre 8 e 16 células em bovinos, o embrião depende dos estoques maternos (GRAF et al., 2014a, 2014b). A maturação molecular não possui uma definição clara, entretanto acredita-se que envolva o estoque de RNAs específicos e algumas proteínas relacionadas à capacidade intrínseca do oócito que favoreça processos moleculares para a ativação do genoma embrionário e desenvolvimento do embrião (SIRARD et al., 2006). Os fatores secretados pelo oócito (FSO), como GDF9, BMP15 e FGFs, são exemplos clássicos de fatores envolvidos

na comunicação parácrina que regulam o funcionamento das células do cumulus e influenciam a qualidade oocitária (CAIXETA et al., 2013; GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008; HUSSEIN et al., 2005).

Sendo assim, a interação entre as células somáticas e o oócito dentro do microambiente folicular tem grande importância no desenvolvimento folicular adequado, influenciando a proliferação celular, formação de FF, crescimento e competência oocitária. Inicialmente, a proliferação e diferenciação celular durante a foliculogênese é governada por vias endócrinas, parácrinas e autócrinas (ALBERTINI; RIDER, 1994). Desta forma a comunicação intercelular é importante para transmissão de informações no ambiente folicular. As comunicações entre as células foliculares e entre as células foliculares e oócito podem ser mediadas por diversos mecanismos. A comunicação por contato entre células pode ocorrer a partir de junções Gap (GJ) entre células, projeções transzonais (TZPs) através da zona pelúcida (ZP) e, como mais recentemente descrito, vesículas extracelulares (VEs) e GJ presentes na fenda das TZPs, o que favorece a transferência de moléculas desde as células do cumulus aos oócitos (Figura 1; ALBERTINI; RIDER, 1994; ALBERTINI et al., 2001; MACAULAY et al., 2014; CLARKE, 2017). A comunicação sem contato entre as células ocorre por meio da secreção de moléculas sinalizadoras no FF (KNIGHT; GLISTER, 2006) assim como por VEs secretadas diretamente no FF, as quais transmitem informações às demais células (DA SILVEIRA et al., 2012; SOHEL et al., 2013). Desta forma, os estudos de processos envolvidos no desenvolvimento da competência oocitária são importantes para esclarecer as necessidades oocitárias fisiológicas que auxiliem na maturação *in vitro* e no desenvolvimento embrionário.

Figura 1 – Demonstração dos tipos de comunicações intercelulares entre células foliculares e oócito.



As comunicações intercelulares existentes no ambiente folicular envolvem junções gap (GJ) entre células somáticas foliculares e entre cumulus e oócitos, onde há passagem de moléculas menores que 1kDa. As projeções transzonais (TZPs), as quais atravessam a zona pelúcida (ZP), dão suporte à comunicação entre cumulus e oócito. Na fenda das TZPs são encontradas VEs e GJ. Ainda, existe a secreção de moléculas e vesículas extracelulares (VEs) no FF, as quais medeiam a transmissão de informações neste ambiente. Fonte: Própria autoria.

2.2 Modificações fisiológicas do folículo ovariano

O FF está contido no antro de folículos ovarianos, local onde células da granulosa e oócitos são desenvolvidos e maturados (GOSDEN et al., 1988). O FF é constituído pelo filtrado do plasma sanguíneo e por produtos secretados pelas células da granulosa (GOSDEN et al., 1988). O suprimento sanguíneo atinge o folículo ovariano mais precisamente ao redor das células da teca, as quais alteram-se de acordo com o crescimento e características foliculares (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010), como relatado em folículos saudáveis e atrésicos (CLARK, 2004).

As alterações do FF têm sido associadas à qualidade oocitária de bovinos e humanos. Diversos estudos demonstram que metabólitos e hormônios do FF possuem relação com a competência oocitária e podem afetar a fertilidade (BENDER et al., 2010; BRIEN; WINGFIELD; SHEA, 2019; LEROY et al., 2004; MATOBA et al., 2014; O'GORMAN et al., 2013). Ademais, a fase folicular, o estágio do ciclo estral e o diâmetro do folículo são importantes fatores que afetam o desenvolvimento da competência oocitária (HAGEMANN et al., 1999; ORSI et al., 2005; SIRARD et al., 2006). Apesar da influência do diâmetro folicular, folículos com tamanhos similares

podem estar em fases fisiológicas distintas. Isto pode ser atribuído às fases da onda folicular (GIMENES et al., 2015; HAGEMANN et al., 1999; VASSENA et al., 2003). Ao longo do ciclo estral bovino, o qual pode ocorrer entre duas e quatro ondas de crescimento folicular, os folículos passam por fases de crescimento, estacionária, de dominância e de atresia.

O uso de biotécnicas da reprodução, como estratégias para manipulação do ciclo estral, têm sido utilizadas com objetivo de avaliar os melhores momentos do ciclo estral e características foliculares que propiciem melhor qualidade oocitária e embrionária (BARUSELLI et al., 2012; MACHATKOVA et al., 1996; SALAMONE; ADAMS; MAPLETOFT, 1999). Machatková et al. (1996) demonstraram que oócitos recuperados de folículos nos dias 14 a 16 do ciclo estral resultaram em maior taxa de produção de blastocistos quando comparado aos dias 2, 7 a 9 ou 19 a 20 após o estro. Entretanto, Hendriksen et al. (2004) observaram maior produção *in vitro* de embriões quando aspirados folículos nos dias 2 e 5 após o estro em relação ao dia 8 (HENDRIKSEN et al., 2004). Vassena et al. (2003) demostraram que oócitos coletados no dia 5 do ciclo estral obtiveram maior taxa de blastocistos em comparação aos dias 2, 3 e 7. Adicionalmente, estudos recentes evidenciaram que folículos puncionados nos dias 1, 3 ou 5 após o estro não afetam a viabilidade dos oócitos e produção *in vitro* de embriões em bovinos e bubalinos (GIMENES et al., 2015). Estes estudos demonstram que os diferentes momentos do ciclo estral podem impactar o ambiente folicular e a competência oocitária, mas que o melhor momento para obtenção de oócitos ainda não foi determinado.

Finalmente, as alterações do ambiente folicular estão relacionadas principalmente com modificações do padrão de hormônios ao longo do ciclo estral (ADAMS et al., 2008). O FF é composto por hormônios como P4, estrógeno, insulina e IGFs, assim como fatores secretados pelos oócitos (O'SHEA et al., 2012). As concentrações de esteroides, como estradiol (E2) e P4, modificam de acordo com o estágio fisiológico do folículo, o qual é variável de acordo com os estágios do ciclo estral (NISHIMOTO et al., 2009). Folículos em fase pré-ovulatória apresentam alterações esteroidogênicas no ambiente folicular como a rápida diminuição do E2 e o aumento de andrógenos, P4 e PGE2 após o pico de LH, o que está relacionado com a preparação para ovulação e maturação oocitária (DIELEMAN et al., 1983; SIRARD et al., 1999). Estas alterações são controladas por gonadotrofinas, as quais atuam nas células foliculares modulando a esteroidogênese folicular. Portanto, as alterações de

concentrações de hormônios esteroides no FF sugerem que há relação com o desenvolvimento folicular e maturação oocitária (IRELAND; COULSON; MURPHREE, 1979).

2.3 A Influência da progesterona no folículo ovariano e oócito

A produção de P4 no ambiente ovariano faz parte do processo de esteroidogênese que ocorre em células da teca e da granulosa dos folículos ovarianos (BAO; GARVERICK, 1998), bem como em células luteais (URSELY; LEYMARIE, 1978). O processo de esteroidogênese no folículo ovariano foi descrito inicialmente como modelo “duas células/duas gonadotrofinas” (FORTUNE, 1986). Resumidamente, este modelo descreve a produção de progestinas oriundas do colesterol, seguido da síntese de andrógenos a partir da ligação do LH aos seus receptores nas células da teca. Em seguida, os andrógenos são aromatizados nas células da granulosa a partir da ligação do FSH a seus receptores, produzindo então 17 beta-estradiol (BAO; GARVERICK, 1998; FORTUNE, 1986; FORTUNE; HILBERT, 1986). Os mRNAs de receptores de LH são encontrados em células da teca logo após a formação do antro folicular e aumentam de acordo com o crescimento folicular (XU et al., 1995), o que indica a importância da esteroidogênese para o desenvolvimento folicular antral. Ao final do desenvolvimento folicular, o FSH induz aquisição de receptores de LH/hCG pelas células da granulosa, o que proporciona aumento da ligação de LH/hCG aos receptores e aumento da produção de P4 por células da granulosa (HILLIER; ZELEZNIK; ROSS, 1978). Adicionalmente, o corpo lúteo formado após a ovulação possui importante função esteroidogênica. O corpo lúteo constitui-se por células luteais pequenas e grandes, as quais se originam das células da teca e granulosa, respectivamente (NISWENDER, 2002). Portanto, de forma semelhante ao que ocorre nas células da teca, a produção de P4 pelo corpo lúteo é estimulada pela ligação de LH aos seus receptores principalmente em células luteais pequenas (NISWENDER, 2002; URSELY; LEYMARIE, 1978). A P4 produzida pelo corpo lúteo atua como importante reguladora do ciclo estral. A sua diminuição após a luteólise estimula a ovulação, enquanto sua permanência após a fertilização oocitária é suporte para a manutenção da gestação (SARTORI; BARROS, 2011).

Além das modificações esteroidogênicas que acompanham o desenvolvimento folicular, o estágio do ciclo estral é um importante fator que influencia a concentração

de hormônios esteroides no FF (KURUIP; DIELEMAN, 1985). Folículos entre 3 e 9 mm de diâmetro apresentaram aumento das concentrações de progestinas no FF desde o dia 1 do ciclo estral até o dia 10, permanecendo as concentrações altas até o dia 20 (IRELAND; COULSON; MURPHREE, 1979). O aumento das concentrações de progestinas observado no fluido de folículos de até 9 mm de diâmetro possui correlação com o padrão de secreção avaliado no plasma sanguíneo (IRELAND; COULSON; MURPHREE, 1979; IRELAND; ROCHE, 1983). Estas modificações de concentração em folículos de mesmo tamanho podem estar relacionadas a fatores extrínsecos aos folículos, ou seja, mediadas pelas variações de gonadotrofinas de acordo com o estágio fisiológico do ovário (KURUIP; DIELEMAN, 1985; PELUSO, 2006). Além do folículo ovariano, o corpo lúteo é uma importante fonte de P4 (URSELY; LEYMARIE, 1978), o qual influencia os padrões hormonais no folículo ovariano. A concentração de P4 plasmática aumenta entre os dias 4 e 12 do ciclo estral bovino e permanece alta até o momento da luteólise (HANSEL; ECHTERNKAMP, 1972). Concomitantemente, o peso do corpo lúteo aumenta significativamente entre os dias 1 a 17 do ciclo estral (IRELAND; COULSON; MURPHREE, 1979). Logo, as diferenças morfofuncionais do corpo lúteo ao longo do ciclo estral indicam que este seja um importante fator para variação das concentrações hormonais no FF.

A P4 está relacionada com importantes funções nos ovários de mamíferos, como o crescimento folicular, ovulação e luteinização (PELUSO, 2006). Inicialmente, o seu papel no FF foi associado com o evento da maturação oocitária, devido à queda da concentração de E2 seguida do aumento da concentração de P4 em folículos pré-ovulatórios logo antes da ovulação (DIELEMAN et al., 1983). Ademais, estudos recentes demonstraram que a inibição da síntese de P4 por CCOs durante a maturação *in vitro* impacta negativamente a maturação oocitária, causando diminuição da expansão das células do cumulus e queda da produção de embriões *in vitro* nos dias 7 e 8 de desenvolvimento (APARICIO et al., 2011; O'SHEA et al., 2017). Estes efeitos podem ser justificados pelo aumento da porcentagem de células consideradas anormais, as quais apresentam alterações em placa metafásica (O'SHEA et al., 2017).

A atuação da P4 é mediada por receptores genômicos (nPRs-A e nPRs-B), os quais atuam como fatores de transcrição, e não genômicos (mPRs alpha/beta e PGRMC1/2), representados por receptores de membrana (APARICIO et al., 2011; PELUSO, 2006). A ação da P4 depende da abundância dos receptores, da afinidade

da ligação entre P4 e receptor e da quantidade de P4 disponível (PELUSO, 2006). Receptores de P4 podem estar presentes em células da teca, células da granulosa, células do cumulus e oócitos e estão envolvidos em funções relacionadas à ovulação e à maturação oocitária. (APARICIO et al., 2011; JO; KOMAR; FORTUNE, 2002; LUCIANO et al., 2011b). A redução dos receptores de P4 no ambiente folicular de camundongos causou menores taxas de ovulação, além de afetar a proliferação e sobrevivência de células da granulosa (SHAO et al., 2003).

Para avaliar a relação entre P4 e qualidade oocitária estudos iniciais demonstraram que a adição de P4 exógena em níveis semelhantes aos encontrados em folículos pré-ovulatórios na maturação *in vitro* de CCOs bovinos causa diminuição das taxas de blastocisto comparado a grupos que não foram suplementados com P4 (SILVA; KNIGHT, 2000). Entretanto, diversos estudos recentes demonstraram que folículos expostos a maiores concentrações de P4 durante seu crescimento estão relacionados com maior fertilidade em vacas de leite e corte comparado a folículos expostos a baixas concentrações de P4 (BISINOTTO; CHEBEL; SANTOS, 2010; DENICOL et al., 2012; NASSER et al., 2011). Estes estudos relacionam as diferentes concentrações de P4 a ondas do ciclo estral distintas (BISINOTTO; CHEBEL; SANTOS, 2010; DENICOL et al., 2012), bem como à suplementação de P4 exógena em uma mesma onda de crescimento folicular (DENICOL et al., 2012; NASSER et al., 2011). Os resultados encontrados nestes estudos indicam que a P4 tenha efeito nos folículos em crescimento e consequentemente na maturação oocitária e qualidade de embriões produzidos.

Portanto, a P4 é um importante hormônio presente no folículo ovariano ao longo de seu desenvolvimento. Além da produção de P4 oriunda das células foliculares, principalmente como substrato para formação do 17 beta-estradiol, o corpo lúteo é uma importante fonte de P4, o qual modula suas concentrações ao longo do ciclo estral, mantendo então a ciclicidade das ondas foliculares. A P4 tem atuação direta em células foliculares e oócito a partir de receptores nucleares e de membrana que são dinâmicos ao longo da maturação oocitária. Desta forma, a ação da P4 parece ter influência no ambiente folicular e na competência oocitária de bovinos, podendo impactar também as moléculas secretadas por células foliculares, como as VEs.

2.4 Os impactos das técnicas de reprodução assistida na competência oocitária e embrionária

As técnicas de reprodução assistida (TRA) têm sido amplamente utilizadas em humanos e animais com objetivo de solucionar problemas de infertilidade, bem como para otimizar a produção de animais de interesse pecuário. As TRA resultaram em mais de 5 milhões de bebês nascidos no mundo (KISSIN; JAMIESON; BARFIELD, 2014) e 612.709 embriões bovinos em 2015 a partir de OPU, grande parte originados da América do Sul (70,35%; SINCLAIR et al., 2016).

Apesar dos bons resultados obtidos pelas TRA, apenas cerca de 30 a 40% dos oócitos desenvolvem-se a blastocisto (RIZOS et al., 2002a; SIRARD, 2016) e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* é inferior aos produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2002b). A alteração dos eventos que envolvem a competência oocitária é um dos principais motivos que levam ao menor potencial de produção *in vitro* (MAO et al., 2014; WATSON, 2007). Além disso, fatores como o estresse causado em gametas e embriões expostos ao ambiente *in vitro*, alterações hormonais específicas nos ovários, aspiração folicular e as condições dos meios de cultivo estão entre as causas que afetam o desenvolvimento embrionário (URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

Entre as consequências da maturação *in vitro* dos CCOs estão a diminuição do número e distribuição de mitocôndria nos oócitos (GE et al., 2012; STOJKOVIC, 2001; ZENG et al., 2009), alteração da morfologia do fuso meiótico, assincronia e atraso da progressão meiótica (SANFINS et al., 2003), alteração na composição da matriz dos CCOs (DUNNING et al., 2007), maior nível de transcritos relacionados à resposta ao estresse nas células do cumulus (TESFAYE et al., 2009a) e distúrbios metabólicos nas células do cumulus que favorecem maior acúmulo lipídico oocitário (DEL COLLADO et al., 2017a, 2017b).

As alterações geradas nos oócitos podem contribuir para menor produção embrionária e desenvolvimento de embriões inviáveis. Já o ambiente inadequado para o desenvolvimento embrionário favorece a sua menor qualidade (RIZOS et al., 2002a). Embriões produzidos *in vivo*, mas cultivados *in vitro* apresentaram menor qualidade em termos de sobrevivência após a vitrificação (RIZOS et al., 2002a). Demais efeitos do cultivo *in vitro* de embriões incluem variações de morfologia e capacidade de eclosão (VAN SOOM; YSEBAERT; DE KRUIF, 1997), de metabolismo energético

(KHURANA; NIEMANN, 2000), menor e mais tardia comunicação intercelular (BONI et al., 1999) e diferença na abundância de transcritos (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004; TESFAYE et al., 2004).

Embriões produzidos *in vitro*, mas cultivados *in vivo* obtiveram melhor qualidade (RIZOS et al., 2002a). Sabe-se que mudanças no meio de cultivo podem afetar os transcritos acumulados nos oócitos, bem como a qualidade dos embriões produzidos (WATSON et al., 2000). A utilização do meio indefinido, como aqueles suplementados com soro fetal bovino (SFB), é um importante fator que compromete a qualidade oocitária e embrionária principalmente devido ao acúmulo de lipídio no citoplasma (ABE et al., 2002; DEL COLLADO et al., 2016; WATSON et al., 2000). Esta alteração em oócitos pode estar relacionada à diferença do perfil lipídico encontrada no SFB e no FF (DEL COLLADO et al., 2016). Por isso, a substituição e a redução de substâncias como SFB nos meios de cultivo por substâncias que mimetizem o sistema reprodutivo são alvos de estudos.

Inicialmente, o co-cultivo de embriões com células do cumulus, granulosa e oviduto foi um relevante recurso para aprimorar o ambiente de cultivo *in vitro*. O primeiro estudo realizado utilizando co-cultivo de oviduto e meio condicionado com células do oviduto no desenvolvimento de embriões bovinos foi realizado por Eyestone e First (1989) e demonstrou maior taxa de produção de embriões quando comparado a meios livres de células ou não condicionados (EYESTONE; FIRST, 1989). Atualmente, o uso de meio condicionado por cultivo de células de oviduto no desenvolvimento embrionário melhorou a qualidade embrionária de forma equivalente ao co-cultivo (LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016). Entretanto, estas técnicas possuem limitações quanto aos cuidados com o cultivo celular, além das variações biológicas (GARCIA; AVELINO; VANTINI, 2004), interações entre componentes do meio, presença de diversos tipos celulares (THOMPSON; PETERSON, 2000) e transmissão de doenças (ORSI; REISCHL, 2007).

Apesar da suplementação dos meios de produção *in vitro* com fontes de proteínas ser importante para o desenvolvimento embrionário, devem-se considerar as necessidades embrionárias fisiológicas (ORSI et al., 2005; THOMPSON; PETERSON, 2000). O FF é uma das substâncias de interesse para suplementação durante a maturação. A substituição do meio suplementado com 10% de SFB por 10% de FF bovino resultou em semelhantes taxas de maturação e produção de embriões; além disso, os blastocistos cultivados com FF apresentaram maiores níveis dos

transcritos *INF-tau* e *IGF-2r* ao fim do desenvolvimento (SATITMANWIWAT et al., 2017). A adição de FF humano durante a maturação *in vitro* de oócitos de camundongo resultou em taxa de maturação e fertilização semelhante aos oócitos obtidos *in vivo* (SERTA et al., 1995). Entretanto, apesar do FF influenciar o potencial de desenvolvimento oocitário, seu efeito na maturação *in vitro* depende das características foliculares, como tamanho, fases de crescimento ou regressão (ALI et al., 2004; SIRARD et al., 1995).

Embora o incremento do FF nos meios de cultivo favoreça a maturação *in vitro*, não se sabe ao certo quais componentes encontrados neste fluido interagem com o CCOs. Por isto, o estudo de fatores presentes no ambiente folicular pode auxiliar no entendimento destes mecanismos de interação entre ambiente folicular e CCOs. As VEs do FF são um destes componentes envolvidos na comunicação intercelular que possuem ação durante a maturação *in vitro* de oócitos (HUNG et al., 2015) e que podem modular o desenvolvimento oocitário e embrionário inicial *in vitro* (DA SILVEIRA et al., 2017).

Enfim, além de produzir maior número de embriões *in vitro*, o grande desafio das TRA atualmente é produzir embriões de maior qualidade, ou seja, que sejam capazes de se desenvolverem, manterem a gestação e gerarem indivíduos saudáveis (RIZOS et al., 2017), semelhante aos embriões produzidos *in vivo*. Para isso é importante esclarecer os mecanismos celulares e moleculares que envolvem o desenvolvimento oocitário e embrionário. A partir destes conhecimentos será possível aproximar o ambiente *in vitro* ao *in vivo* com objetivo de otimizar a qualidade oocitária e embrionária para que seja possível obtenção de maior sucesso nas gestações.

2.5 Caracterização das vesículas extracelulares

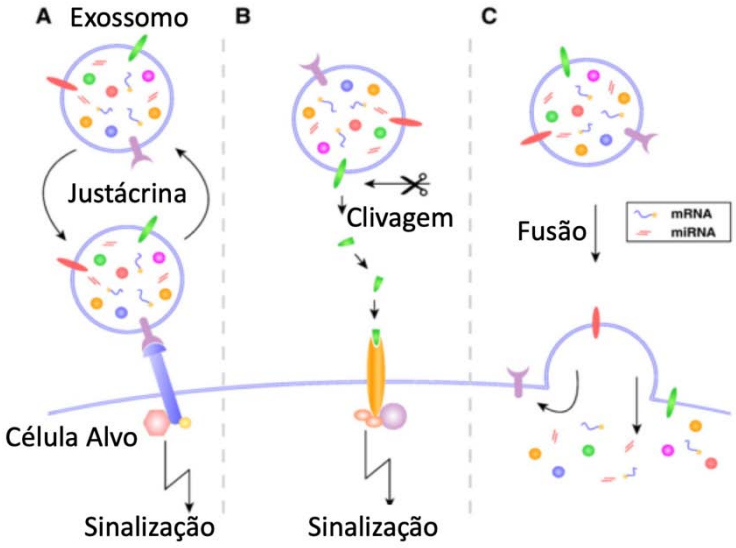
Vesículas extracelulares (VEs) são nanopartículas secretadas por células, compostas por bicamada fosfolipídica. São encontradas no ambiente extracelular e incluem exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (BARKALINA et al., 2015; GYÖRGY et al., 2011). As VEs são liberadas no ambiente extracelular de forma constitutiva em resposta a estímulos específicos, em situações fisiológicas e patológicas (TANNETTA et al., 2014). A distinção entre as VEs é baseada no tamanho, biossíntese e conteúdo de proteínas. Porém, os tipos de VEs nem sempre

são bem definidos (TANNETTA et al., 2014), por isso é recomendado o uso do termo “vesículas extracelulares”.

São considerados exossomos VEs entre 30 a 150 nm; microvesículas entre 100 a 1000 nm e corpos apoptóticos entre 1 a 5μm (TANNETTA et al., 2014). A biossíntese de exossomos envolve a formação corpos multivesiculares (*Multivesicular Bodies*– MVB) a partir de uma primeira endocitose e formação de vesículas intraluminais (ILV) em seu interior. As ILVs são liberadas ao meio extracelular após fusão dos MVB com a parte interna da membrana plasmática, resultando na liberação das ILV, as quais são chamadas de exossomos (MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010; PAN et al., 1985; THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002). Já microvesículas são formadas a partir de liberações por brotamento da membrana plasmática em resposta a estímulos ou estresse (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009; TANNETTA et al., 2014; THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002) e corpos apoptóticos são liberados das células em processos de apoptose, podendo conter organelas e fragmento nuclear (PAVANI et al., 2017). O conteúdo de proteínas encontradas em VEs é semelhante ao da célula de origem, o que indica funções especializadas (SIMPSON; JENSEN; LIM, 2008). Entretanto, não há marcadores específicos para cada subtipo de VEs, apesar de algumas proteínas, como HSP70, Alix, TSG101, clathrin, CD63, CD81 e CD9 serem abundantes em exossomos (MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010; TANNETTA et al., 2014).

Apesar das divergências entre os subtipos de VEs, exossomos e microvesículas possuem ações importantes em processos biológicos. VEs possuem material bioativo como RNAm e microRNAs (VALADI et al., 2007), proteínas (SIMPSON; JENSEN; LIM, 2008) e lipídios (SUBRA et al., 2007) que caracterizam suas funções de modulação em células receptoras. Os mecanismos de comunicação entre VEs e células-alvo incluem: 1) Interação entre as proteínas de membrana que ativam células alvo; 2) Ligação de produto de clivagem de proteínas de membrana das VEs em receptores de células alvo; 3) Transferência de moléculas a partir da fusão de VEs e célula alvo (Figura 2; MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010).

Figura 2- Representação dos mecanismos de comunicação entre VEs e células alvo.



A comunicação das VEs com células alvo ocorre **(A)** a partir da interação entre proteínas de membrana da VE e das células-alvo, **(B)** ligação de produtos de clivagem de proteínas das VEs com receptores das células-alvo e **(C)** transferência de moléculas por meio de fusão entre VE e células-alvo. Fonte: adaptado de MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907–1920, 2010.

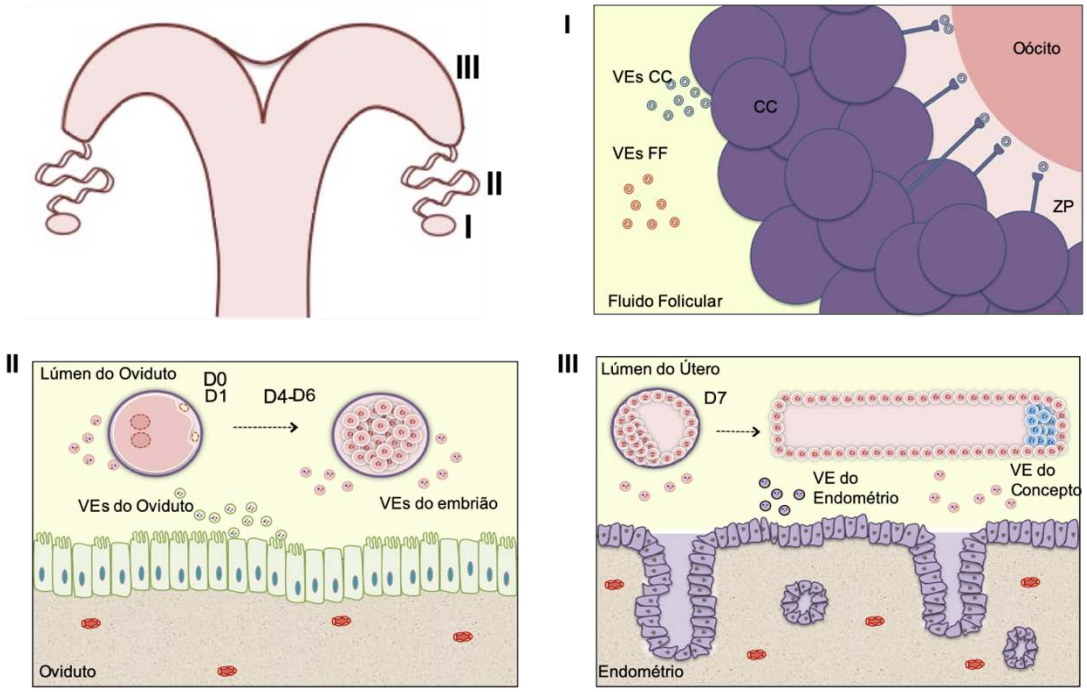
O critério para isolamento de VEs é que sejam obtidas de fluidos extracelulares oriundos de meios de cultivo ou fluido corporal (LÖTVALL et al., 2014). O método ideal de isolamento varia de acordo com a questão que deve ser respondida, aplicação, pureza e concentração desejada (LÖTVALL et al., 2014; WITWER et al., 2013). Os métodos utilizados para isolamento e análise de VEs estabelecidos pela "*International Society for Extracellular Vesicles*" (ISEV) incluem ultracentrifugação, filtração, precipitação por polímeros, imunoafinidade e técnicas de microfluídica, podendo ser utilizados mutuamente para isolamento (WITWER et al., 2013). As análises do produto de isolamento podem ser realizadas por microscopia eletrônica e de força atômica, rastreamento óptico de partículas, citometria de fluxo e *western blotting*, com objetivo de se avaliar a morfologia, o tamanho, a concentração e o conteúdo proteico (WITWER et al., 2013).

2.6 Vesículas extracelulares na reprodução de fêmeas

Visto a contribuição das VEs na comunicação intercelular, muitos estudos têm mostrado a sua influência em processos reprodutivos. Neste âmbito, VEs já foram

descritas em FF (DA SILVEIRA et al., 2012), oviduto (AL-DOSSARY; STREHLER; MARTIN-DELEON, 2013), endométrio (NG et al., 2013) e secretadas em meio de cultivo *in vitro* de embriões (MELLISHO et al., 2017; Figura 3). O presente estudo tem como foco principal o estudo de VEs pequenas oriundas do ambiente folicular e do oviduto bovino.

Figura 3- Representação da participação de VEs pequenas na comunicação intercelular no ambiente reprodutivo de fêmeas, como (I) no ovário, (II) no oviduto e (III) no útero.



As VEs estão sendo estudadas em diversos ambientes reprodutivos. (I) No ambiente folicular, VEs pequenas foram isoladas de FF e são um dos mecanismos de comunicação entre células foliculares e CCOs. As VEs do FF estão envolvidas com desenvolvimento folicular e maturação oocitária. (II) No oviduto, as VEs fazem parte da comunicação entre oócitos recém ovulados e fertilizados e embriões em início de desenvolvimento. (III) No ambiente uterino, as VEs são importantes mediadoras da comunicação entre embriões e útero, podendo estar envolvidas no reconhecimento materno da gestação. Legenda: VEs= Vesículas extracelulares; FF= Fluido folicular; CC= células do cumulus; ZP= Zona pelúcida; D0= dia da fertilização; D= representação dos dias após fertilização. Fonte: Adaptado de DE ÁVILA et al. Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. **Animal Reproduction**, v.16, n.1, p.31-38, Jan./Mar. 2019.

2.6.1 Vesículas extracelulares no fluido folicular

A primeira descrição de VEs em FF foi em éguas (DA SILVEIRA et al., 2012). Neste estudo foi confirmado o envolvimento de VEs na comunicação com células da

granulosa a partir do englobamento destas vesículas por células da granulosa *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, diferentes miRNAs foram encontrados em VEs de éguas jovens e idosas. Diferente conteúdo de miRNAs em VEs de FF também foi observado em mulheres jovens e idosas (DIEZ-FRAILE et al., 2014). MiRNAs estão presentes livres no FF, porém a maioria deles está em VEs e diferem de acordo com o crescimento oocitário, sendo estas VEs capazes de aumentar os níveis de miRNAs endógenos em células foliculares (SOHEL et al., 2013). Os miRNAs presentes em VEs do FF de humanos estão envolvidos na regulação de vias relacionadas ao desenvolvimento folicular e à maturação oocitária, como WNT, MAPK, ErbB, e TGF-beta (SANTONOCITO et al., 2014). Durante o desenvolvimento folicular em éguas, VEs do FF estão envolvidas na regulação das vias TGF-beta em células da granulosa a partir da transferência de moléculas de miRNAs, RNAm e proteínas (DA SILVEIRA et al., 2014). De forma semelhante, miRNAs encontrados em células da granulosa, CCOs e VEs oriundas de células da granulosa ou CCOs de bovinos são presumíveis reguladores de vias como PI3K- Akt, MAPK e WNT (ANDRADE et al., 2017a).

Após esclarecimentos iniciais do envolvimento de VEs no ambiente folicular de diversas espécies, estudos avaliando a funcionalidade destas VEs foram desenvolvidos. Recentemente, foi demonstrado que a suplementação com VEs oriundas de FF bovino de folículos pequenos (3-5 mm) e grandes (>9 mm) durante a maturação *in vitro* induzem a expansão das células do cumulus dos CCOs, contudo VEs isoladas de folículos pequenos causam melhor expansão (HUNG et al., 2015). Demais efeitos encontrados a partir da adição de VEs pequenas obtidas de folículos de 3-6 mm durante a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* de bovinos incluem alterações nos níveis de transcritos, aumento da taxa de produção de blastocistos e modificações na metilação e hidroximetilação global do DNA embrionário (DA SILVEIRA et al., 2017). Ainda, recentemente foi demonstrado que a suplementação de VEs do FF recupera CCOs bovinos expostos ao estresse térmico durante a maturação *in vitro* (RODRIGUES et al., 2019) e que VEs de folículos de vacas expostas ao ambiente de estresse ou conforto térmico, quando suplementadas durante a maturação *in vitro*, modificam o padrão transcricional de CCOs bovinos de forma distinta (MORALES DALANEZI et al., 2019).

Navakanitworakul e colaboradores (2016) demonstraram que a concentração de VEs no FF e o seu conteúdo de miRNAs é alterado de acordo com a dimensão folicular, mas o tamanho das VEs não se altera. Este estudo sugere que há mudanças

na biogênese ou endocitose de VEs durante o desenvolvimento folicular (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016). Hung e colaboradores (2017) demonstraram que VEs originadas de folículos de diferentes dimensões estimulam de forma distinta a proliferação de células da granulosa, o que condiz com o fato de que há diferente conteúdo ou do englobamento destas VEs de acordo com o tamanho do folículo ovariano (HUNG et al., 2017). Neste estudo, Hung e colaboradores evidenciaram que VEs secretadas por folículos pequenos (3-5 mm) são mais incorporadas pelas células da granulosa em comparação às VEs secretadas por folículos maiores (>9mm). Além disso, estudos demonstraram que células da granulosa de bovino cultivadas *in vitro* secretam VEs enriquecidas em antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo e são capazes de transportar este conteúdo para células receptoras, funcionando como um mecanismo de defesa para estas células (SAEED-ZIDANE et al., 2017). Portanto, a partir destes estudos é possível verificar que as VEs são modificadas de acordo com suas origens foliculares e estímulos, possuindo papel importante na modulação do ambiente folicular. A participação das VEs neste ambiente parece favorecer as transformações no folículo ovariano. Desta forma, os estudos investigando o conteúdo e os efeitos de VEs oriundas de ambientes foliculares distintos geram expectativas para aprimorar o conhecimento dos papeis das VEs nas funções fisiológicas deste ambiente.

2.6.2 Vesículas extracelulares no oviduto

O oviduto é um importante órgão localizado entre ovário e útero, onde ocorre a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial, incluindo a ativação do genoma embrionário. O epitélio do oviduto é constituído por células ciliadas e secretórias que colaboram com estes processos. Estas células estão envolvidas na secreção do fluido do oviduto, que possui importante papel na fertilização oocitária e no desenvolvimento embrionário (AVILÉS; GUTIÉRREZ-ADÁN; COY, 2010; LEESE et al., 2008). As VEs são um dos componentes do fluido do oviduto que favorecem o desenvolvimento e a qualidade embrionária (ALMIÑANA et al., 2017; LOPERA-VASQUEZ et al., 2017).

A presença de VEs no fluido do oviduto foi descrita pela primeira vez em murinos e denominada “oviductossomos” (AL-DOSSARY; STREHLER; MARTIN-DELEON, 2013). Al-dossary e colaboradores mostraram que os oviductossomos em murinos possuem uma proteína de membrana nomeada “*Plasma Membrane* Ca^{2+} -

ATPase 4a" (PMCA4a) envolvida na hiperativação espermática e fertilidade. Em seguida, estudos em bovinos avaliaram o perfil proteico de VEs secretadas por células do epitélio do oviduto (BOEC) *in vivo*, a partir do lavado do oviduto, e *in vitro*, a partir do cultivo de células do oviduto (ALMIÑANA et al., 2017). As VEs destes diferentes ambientes apresentaram distintas características quantitativas e qualitativas. Em suma, proteínas que possuem papel na fertilização e gestação inicial como "*oviductal glycoprotein*" (OVGP1), "*heat shock protein A8*" (HSPA8) e "*myosin 9*" (MYH9) estavam presentes nas VEs secretadas pelo oviduto *in vivo*. Já VEs oriundas de oviduto *in vitro* não possuíam OVGP1 (ALMIÑANA et al., 2017), uma proteína característica do oviduto que está associada à maturação da zona pelúcida oocitária (AVILÉS; GUTIÉRREZ-ADÁN; COY, 2010).

A suplementação com VEs oriundas de oviduto em meios de cultivo *in vitro* de embriões tem mostrado efeitos satisfatórios no desenvolvimento embrionário, podendo reproduzir efeitos da adição do meio condicionado por células do oviduto e ser uma alternativa à adição de SFB nos meios de cultivo (LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016). A internalização de VEs secretadas por células do oviduto *in vivo* por embriões foi comprovada e a comunicação envolvendo VEs apenas refrigeradas ou após submetê-las ao congelamento mostraram aumento da produção e qualidade embrionária (ALMIÑANA et al., 2017). Embriões tratados com VEs de meio de cultivo de células do oviduto apresentaram maior número de células totais e melhor qualidade relacionada à criotolerância quando comparados aos embriões cultivados sem VEs (LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016). Ainda neste estudo verificaram-se modificações dos níveis de transcritos como aumento de *PAG1*, relacionado à implantação do embrião, quando as VEs do oviduto foram adicionadas ao meio de cultivo (LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016).

De maneira mais específica, alguns estudos caracterizaram VEs de diferentes regiões do oviduto bovino. As VEs oriundas da região do istmo resultaram em embriões com maior sobrevivência após vitrificação em comparação aos tratados com VEs oriundas da ampola (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017). Este aumento da qualidade pode estar relacionado às modificações de transcritos como a *AQP3*, um canal regulador do trânsito de água na membrana, o qual possui maiores níveis em embriões tratados com VEs secretadas pelo istmo em comparação aos cultivados em meio suplementado com SFB. Além disso, o transcrito *LDLR*, referente ao receptor de lipídio, estava menos abundante em embriões cultivados com SFB, podendo ser

consequência do alto conteúdo lipídico devido ao meio suplementado com SFB (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017). Adicionalmente, um estudo recente investigou os efeitos dos diferentes estágios do ciclo estral no conteúdo de VEs do oviduto bovino (ALMIÑANA et al., 2018). Neste estudo, foi demonstrado que o perfil hormonal variável ao longo do ciclo estral tem influência na composição de RNAm, miRNAs e proteínas de VEs do oviduto, as quais estão envolvidas em processos de interação entre gametas e oviduto que favorecem a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (ALMIÑANA et al., 2018).

Em conclusão, VEs secretadas por células do oviduto estão envolvidas na comunicação com gametas e embriões na fase inicial de desenvolvimento. Esta comunicação pode favorecer a maturação final e fertilização dos oócitos e a qualidade do embrião gerado, podendo ser utilizadas como forma complementar à suplementação de VEs do FF durante a produção *in vitro* de embriões. Entretanto, os estudos mais recentes indicam que existem modificações do conteúdo das VEs de acordo com a origem das VEs (*in vivo* ou *in vitro*), a localização do oviduto em que estas VEs são obtidas e a influência hormonal do ciclo estral. Desta forma, as VEs do oviduto geram perspectivas positivas para beneficiar as TRA, visto que podem ser uma alternativa para aprimorar os meios de fertilização e cultivo embrionário *in vitro*. Porém mais estudos devem ser realizados para avaliação dos conteúdos e da funcionalidade do uso dessas VEs.

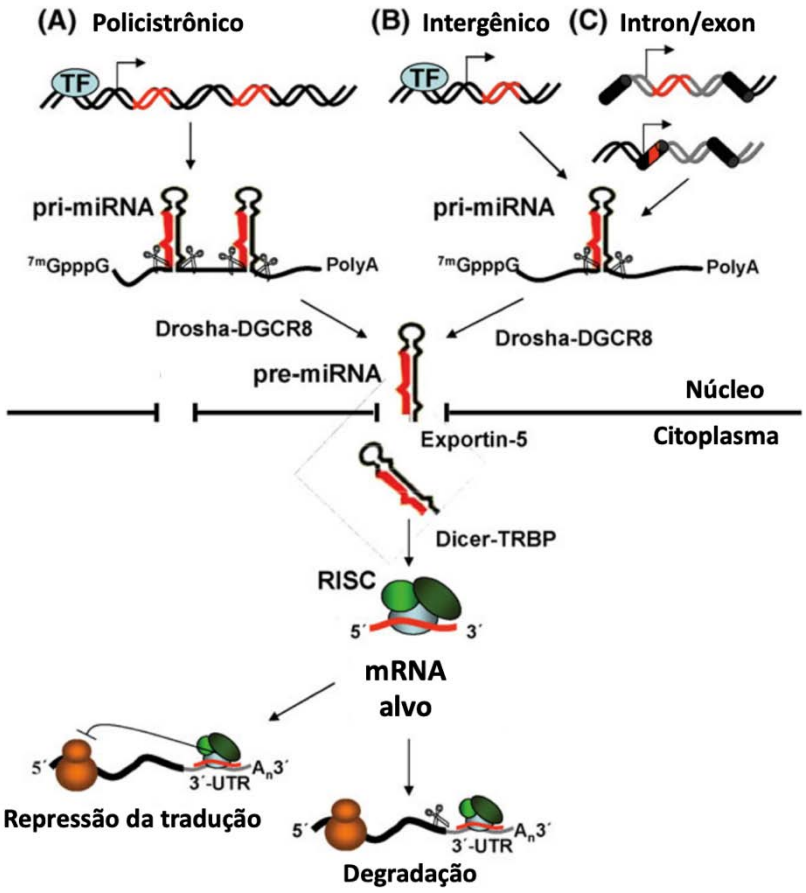
2.7 MicroRNAs

MiRNAs são pequenas sequências de 20 a 24 nucleotídeos não codificadores de proteínas que estão envolvidos na regulação pós-transcricional (HOSSAIN et al., 2012; LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001). A função dos miRNAs foi descrita pela primeira vez por Lee, Feinbaum e Ambros (1993), em estudo que associou a interação e complementariedade de *lin-4* à região 3'UTR do transcrito *lin-14*, resultando na regulação dos níveis da proteína LIN-14 em *C. elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Sabe-se que 60% dos genes codificadores de proteínas são alvos conservados para miRNAs (FRIEDMAN et al., 2009) e estão relacionados com funções biológicas em mamíferos (BARTEL, 2018). Estudos envolvendo a deleção de miRNAs mostram sua relação com diversas modificações

fenotípicas em mamíferos, como revisado por Bartel (2018). Por isso a importância de estudar as modulações destes miRNAs em processos fisiológicos e patológicos.

Os miRNAs maduros são as formas funcionais resultantes de sucessivas etapas de processamento das formas primárias (pri) e precursoras (pre) de miRNAs (Figura 4; HOSSAIN et al., 2012). As sequências codificadoras de miRNAs podem estar dispostas no genoma em agrupamentos que são transcritos de forma policistrônica, ou seja, diversos miRNAs são transcritos e em seguida são clivados para formação de múltiplos miRNAs; ou transcritos individualmente a partir de regiões intergênicas e em regiões de introns ou exons (FAZI; NERVI, 2008). Primeiramente, genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polymerase II (pol II), dando origem ao miRNA primário (pri-miRNA), o qual apresenta estrutura "*7-methyl guanosine cap*" e cauda poly-A nas regiões 5' e 3', respectivamente (LEE et al., 2004). Em seguida, sob ação da RNase III- Drosha e do cofator DGCR8 os pri-miRNAs são clivados e formam os RNAs precursores (pre-RNAs), estrutura que contém o "*hairpin-loop*", composto por aproximadamente 70 nucleotídeos (LEE et al., 2002, 2003; ZENG; CULLEN, 2003). O pre-miRNA é exportado para o citoplasma por meio da proteína transmembrana exportina-5 em conjunto com o co-fator Ran-GTP (YI et al., 2003) e é processado pela RNase III- Dicer para formação do miRNA maduro, de aproximadamente 22 nucleotídeos (LEE et al., 2002). Após esta etapa há formação do miRNA duplex, com duas fitas, sendo uma ou ambas de fato o miRNA maduro (HOSSAIN et al., 2012) que associa-se principalmente à proteína argonauta para formar o complexo de silenciamento RISC (RNA-induced silencing complex; KIM, 2005; HONG et al., 2008). Este complexo atua mediando a repressão ou degradação de RNAm alvos ao ligar-se na região 3' UTR do transcrito. Em mamíferos, sugere-se que a maioria dos miRNAs tenha função de reprimir a tradução a partir do pareamento imperfeito dos miRNAs ao alvo, enquanto a degradação do RNAm é prevalente em plantas determinado pelo pareamento perfeito dos miRNAs aos alvos (Figura 4; RHOADES et al., 2002; CUELLAR; MCMANUS, 2005). Desta forma, os miRNAs são considerados importantes "escultores" do transcriptoma, visto suas funções moduladoras de RNAms e consequentemente suas proteínas em diferentes tipos celulares (BARTEL, 2018).

Figura 4 – Representação esquemática dos processos envolvidos na biossíntese de miRNAs.



O miRNA é formado a partir da transcrição do DNA de forma (A) Policistrônica, (B) de regiões intergênicas ou (C) de regiões de introns ou exons pela RNA Polimesase II e posteriores processamentos pelas enzimas Drosha e Dicer. O miRNA maduro, representado por uma das fitas do miRNA duplex (em vermelho), atua na repressão da tradução ou degradação do RNAm após formação do complexo de silenciamento (RISC). Fonte: Adaptado de FAZI,F e NERVI,C. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. **Cardiovascular research**, v.79, p. 553-561, 2008.

Os processos reprodutivos como desenvolvimento e atresia folicular, maturação de gametas, luteólise e desenvolvimento embrionário são modulados pela expressão e interação de diversos genes. Visto que os miRNAs são considerados importantes reguladores de transcritos, estes estão envolvidos e podem influenciar eventos reprodutivos (DA SILVEIRA et al., 2015a; HOSSAIN et al., 2012; ZHANG et al., 2017). O envolvimento dos miRNAs na reprodução foi evidenciado a partir da ausência da enzima Dicer1, envolvida na biogênese de miRNAs, em células da granulosa, oviduto, útero e cérvix, que causou alterações morfológicas e funcionais no trato reprodutivo e afetou a fertilidade de camundongas (HONG et al., 2008).

O possível papel de miRNAs no desenvolvimento oocitário e embrionário pode ser visto pelo perfil de expressão de miRNAs alterados entre oócitos imaturos e maturados, entre estruturas envolvidas no desenvolvimento embrionário, desde oócito até o desenvolvimento de blastocisto, e durante o crescimento oocitário (TESFAYE et al., 2009b). Estudo do perfil de miRNAs em células da granulosa e CCOs mostram variação nos níveis de miRNAs, entretanto estes miRNAs regulam vias comuns que estão associadas ao desenvolvimento folicular e oocitário (ANDRADE et al., 2017a). MiRNAs específicos como miR-21, aumentado em resposta à ovulação, possui função antiapoptótica em células da granulosa e sua diminuição resulta em menor taxa de ovulação em ratas (CARLETTI; FIEDLER; CHRISTENSON, 2010). Além disso, sabe-se que a expressão dos miRNAs pode ser correlacionada com a competência de embriões bovinos, havendo divergências na abundância de miRNAs em meio de cultivo entre mórulas que se desenvolveram a blastocistos ou que degeneraram (KROPP; SALIH; KHATIB, 2014).

Os miRNAs associados a VEs possuem papel importante durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. Os miRNAs no ambiente folicular e enriquecidos em VEs podem ter perfil variado de acordo com modificações hormonais (SANG et al., 2013; SCHAUER et al., 2013). Entre eles, os miR-21, miR-132 e miR-212 são exemplos de miRNAs regulados por LH encontrados no ambiente folicular e envolvidos em processos de sinalização, sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (FIEDLER et al., 2008; SCHAUER et al., 2013). Ainda, miR-132, miR-320, miR-520c-3p, miR-24, miR-222, miR-24, miR-193b e miR-483-5p estão presentes no FF e relacionados à regulação da esteroidogênese (SANG et al., 2013). Os miRNAs miR-125 e miR-199 estão presentes em VEs de folículos pré-ovulatórios e associados ao período de transição folicular e luteal e têm como alvo genes envolvidos na maturação oocitária e expansão das células do cumulus (DA SILVEIRA et al., 2012; MCBRIDE et al., 2012). Por fim, a partir destas informações é possível sugerir que os miRNAs são importantes moduladores pós-transcricionais e componentes das VEs. Desta forma, podem ser utilizados como biomarcadores e para melhor entendimento da sua participação em processos biológicos e patológicos.

2.8 Avanços e perspectivas do uso de vesículas extracelulares

O estudo do envolvimento de VEs em processos biológicos tem criado perspectivas positivas para sua utilização em rotinas laboratoriais. A estrutura das VEs formada por bicamada lipídica permite que sejam uma forma segura de transportar moléculas em comparação a moléculas livres em fluidos (SKOG et al., 2008; STREMERSCH; SMEDT; RAEMDONCK, 2016; TAYLOR; GERCEL-TAYLOR, 2008). Por isso, os mecanismos moleculares que envolvem VEs como forma de comunicação intercelular podem contribuir para desenvolvimento de agentes reguladores com potencial biológico, diagnóstico e terapêutico (SAADELDIN, I.M.; OH, H.J.; LEE, 2015). As VEs possuem grande propensão em serem utilizadas como biomarcadores. Estudos recentes têm demonstrado que VEs fazem parte de métodos diagnósticos denominados biópsias liquidas (SKOG et al., 2008; YOSHIOKA et al., 2014). Um exemplo relevante é o fato da concentração de VEs e o seu conteúdo de miRNA encontrado no sangue de pacientes com câncer aumentarem em comparação aos pacientes saudáveis (RABINOWITS et al., 2009). O conteúdo de VEs pode ser variável de acordo com a sua célula de origem e estas variações são correlacionadas com VEs encontradas no sangue, como demonstrado após a indução de estresse celular (JONG et al., 2012) e a partir de células de origem tumoral (SKOG et al., 2008). Taylor e Gercel-Taylor (2008) demonstraram que VEs de pacientes com câncer de origem epitelial apresentam a proteína EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) em sua superfície, o que permite isolamento específico de VEs que possuem esta proteína. Neste estudo, foi demonstrado que mulheres que não possuem o câncer de ovário ou que possuem doenças ovarianas benignas possuem menor concentração de VEs com EpCAM em comparação às mulheres que apresentam o câncer de ovário. Ainda neste estudo, os autores evidenciaram que a concentração de VEs especificas aumentam de acordo com o avanço do estágio da doença e há alta correlação entre oito miRNAs específicos de células tumorais de ovário (miR-21; miR-141; miR-200a; miR-200b; miR-200c; miR-203; miR-205; e miR-214) e VEs isoladas do sangue, o que demonstra a possibilidade do uso de VEs como assinatura de cânceres e como alternativa para um diagnóstico precoce (TAYLOR; GERCEL-TAYLOR, 2008).

Além do potencial uso em diagnóstico, as VEs têm expressiva possibilidade de serem utilizadas como forma terapêutica, já que são consideradas transportadoras específicas de moléculas como ácidos nucleicos (NGUYEN; SZOKA, 2012). As VEs

ainda possuem vantagens em comparação ao uso de células como terapia, visto que não são capazes de replicar e que podem ser filtradas para esterilização já que possuem pequeno tamanho (KORDELAS et al., 2014). O envolvimento de VEs como mediadora de resposta imunológica foi demonstrado inicialmente a partir do seu papel como apresentadoras de antígeno (RAPOSO et al., 1996). Ainda na década de 90, foi realizado o primeiro estudo aplicando VEs oriundas de células dendríticas como forma terapêutica, demonstrando uma função de supressão de células tumorais em camundongos (ZITVOGEL et al., 1998). A partir de então, inúmeros estudos investigaram o uso de VEs de forma terapêutica, como por exemplo em tratamento de alergias (MAGDALENA et al., 2019), de doenças autoimune e inflamatórias (KORDELAS et al., 2014; LIU et al., 2015), de doenças cardíacas (BIAN et al., 2014) e como forma de preservar células ovarianas após tratamentos quimioterápicos (SUN et al., 2017; XIAO et al., 2016).

Em reprodução humana e animal, as VEs têm sido exploradas com objetivo de elucidar suas funções biológicas e, a partir de então, buscar formas rápidas e eficientes para certificar o sucesso da reprodução. Foi demonstrado que vacas com mastite subclínica, a qual afetou a qualidade de células do cumulus e de oócitos, apresentaram menor tamanho de VEs em FF em comparação a vacas saudáveis (SANTOS et al., 2018). O papel de VEs como biomarcadores secretados por embriões bovinos foi descrito inicialmente por Mellisho et al. (2017), em que demonstraram a presença destas VEs em meio de cultivo de embriões bovinos. As VEs em cultivo *in vitro* de embriões apresentaram maiores concentrações em embriões produzidos a partir da fertilização *in vitro* quando comparados a embriões partenogenéticos, sugerindo então influência das diferentes origens embrionárias (MELLISHO et al., 2017). As VEs circulantes no sangue também têm mostrado ser uma ferramenta não invasiva para avaliação da fertilidade de bovinos (DE BEM et al., 2017; KOH et al., 2018). Koh e colaboradores (2018) demonstraram que vacas com maior fertilidade possuem maior concentração de VEs plasmáticas em comparação a vacas com menor fertilidade, as quais transportam maior número de proteínas nas VEs (KOH et al., 2018). Adicionalmente, fêmeas bovinas que tiveram perda inicial da gestação de clones aos 21 dias apresentaram menor quantidade de miRNAs transportados por VEs plasmáticas em comparação a fêmeas em que a gestação de clones e embriões oriundos de inseminação artificial evoluíram (DE BEM et al., 2017). Neste mesmo estudo foi demonstrado que os miRNAs diferentes entre as VEs são possíveis

reguladores de vias relacionadas ao estabelecimento da gestação e ao desenvolvimento embrionário.

Além do uso das VEs como possíveis biomarcadores, muitos estudos utilizam as VEs como forma de suplementação na reprodução. Vesículas adicionadas ao meio de maturação de CCOs que foram expostos ao estresse térmico por 14 horas foram capazes de recuperar taxas de produções de blastocistos *in vitro,* semelhante à produção de CCOs que não foram expostos ao estresse térmico (RODRIGUES et al., 2019). A suplementação de VEs oriundas de células amnióticas foi capaz de diminuir a apoptose em células da granulosa de camundongos após tratamento quimioterápico. O efeito de recuperação das células da granulosa foi relacionado ao transporte do miR-10a a partir das VEs para células da granulosa (XIAO et al., 2016). Além disso, a suplementação de VEs do FF durante a maturação e cultivo *in vitro* (DA SILVEIRA et al., 2017) e de VEs do oviduto durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos aumentou de forma significativa a taxa de produção de embriões produzidos *in vitro* (ALMIÑANA et al., 2017; LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016) quando comparado aos grupos sem suplementação de VEs. Com objetivo de facilitar a utilização das VEs, Almiñana e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos da suplementação de VEs frescas ou após congelamento. Os resultados demonstraram que o uso de VEs previamente congeladas na suplementação de embriões gera maior número de embriões no dia 7 de produção, maior número de embriões eclodidos no dia 9 e embriões com maior número de células em comparação aos grupos suplementados com VEs frescas ou sem suplementação, o que viabiliza sua utilização na prática laboratorial. Ainda, foi demonstrado que a depleção de VEs do SFB e o uso de VEs oriundas do oviduto no cultivo de embriões favoreceram a vitrificação dos embriões, uma importante técnica que tem sido estudada para otimização do uso de animais produzidos *in vitro* (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017; LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016).

Por fim, apesar do uso promissor das VEs para aprimorar técnicas de reprodução, ainda existem desafios para tornar seu uso acessível. Primeiramente, é importante conhecer os principais conteúdos das VEs em situações distintas. Isso porque, as VEs são obtidas de fluidos biológicos, os quais passam por constante variação, o que pode afetar o conteúdo e a concentração das VEs. A partir da obtenção de conhecimentos mais detalhados da dinâmica e conteúdo destas VEs será possível utilizá-las de forma mais fidedigna. Além disso, a obtenção e purificação de

VEs para o uso diagnóstico e terapêutico exige técnicas e equipamentos específicos, o que dificulta sua aplicabilidade. Para solucionar estas questões, o mercado de biotecnologia tem criado produtos para facilitar a obtenção e uso de VEs. Os pesquisadores também têm desenvolvido métodos com alta sensibilidade de detecção de VEs em fluidos sem necessidade de seu isolamento (YOSHIOKA et al., 2014). Uma outra alternativa para utilização de VEs de fluidos biológicos pode ser o uso de VEs sintéticas e semi-sintéticas, as quais são capazes de ser produzidas de forma definida e conhecida, como revisado por GARCÍA-MANRIQUE et al. (2018). Semelhante as VEs, as VEs sintéticas possuem capacidade de serem entregues para células receptoras e de carrearem moléculas desejáveis, como miRNAs, causando efeitos semelhantes a VEs biológicas (XIAO et al., 2016). Portanto, a partir de estudos das variações dos conteúdos de VEs e seus efeitos será possível que seu uso seja aplicado como biomarcador e suplemento para benefício da saúde e reprodução de humanos e animais.

3 HIPÓTESES, OBJETIVOS, JUSTIFICATIVAS E DESENHO EXPERIMENTAL

3.1 Estudo 1: Caracterização de vesículas extracelulares pequenas oriundas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral bovino.

Hipótese:

Vesículas extracelulares pequenas oriundas do fluido de folículos de diferentes estágios do ciclo estral bovino (pós-ovulatório e meio de ciclo) possuem características morfológicas semelhantes, mas diferente perfil de miRNA.

Objetivo Geral:

Avaliar as características morfológicas e os perfis de miRNAs maduros e precursores carregados por VEs pequenas oriundas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral bovino.

Objetivos específicos:

- Determinar momentos do ciclo estral distintos (períodos pós-ovulatório e em meio de ciclo estral) de acordo com a morfologia do corpo lúteo e as diferentes concentrações de progesterona folicular para obtenção de fluido de folículos pequenos (3-6 mm de diâmetro).
- Isolar e caracterizar VEs de fluido de folículos pequenos de acordo com morfologia, tamanho, concentração e presença de proteínas específicas.
- Avaliar o perfil de miRNAs maduros e precursores carregados por VEs pequenas obtidas de folículos pequenos em diferentes momentos do ciclo estral.
- Investigar vias biológicas que podem ser reguladas por miRNAs diferentemente expressos entre VEs pequenas oriundas de folículos em momentos distintos do ciclo estral.

Justificativa:

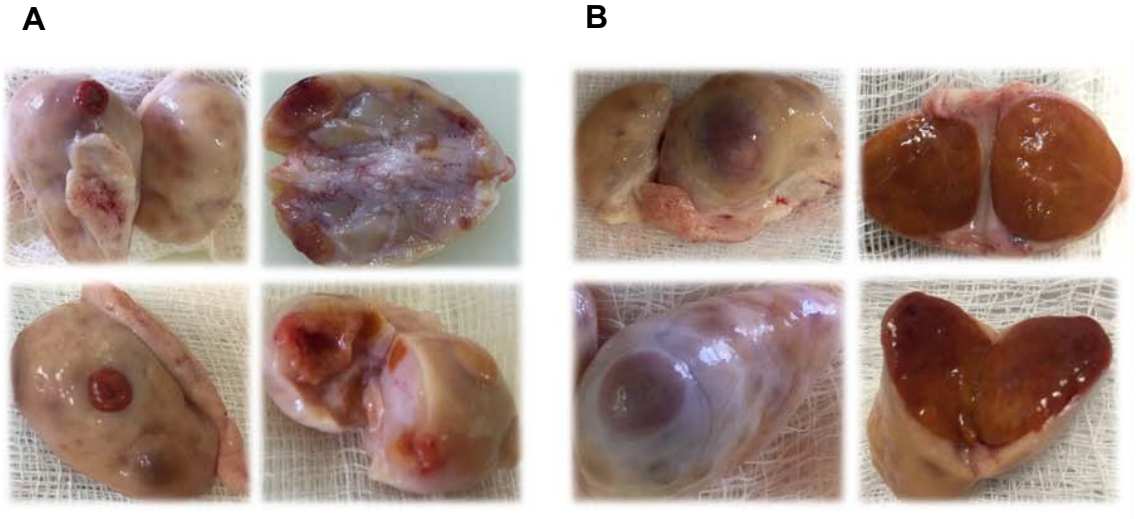
A comunicação existente no ambiente folicular entre células da granulosa, células do cumulus e oócitos é essencial para o desenvolvimento folicular e a

maturação oocitária. Entretanto, esta comunicação é dinâmica e pode variar de acordo com os estágios do ciclo estral. Isto porque, os folículos são expostos a diferentes fatores hormonais ao longo do ciclo estral. Sendo assim, estes fatores são potenciais reguladores da transcrição celular e, portanto, podem afetar o conteúdo molecular de VEs no ambiente folicular.

Desenho experimental:

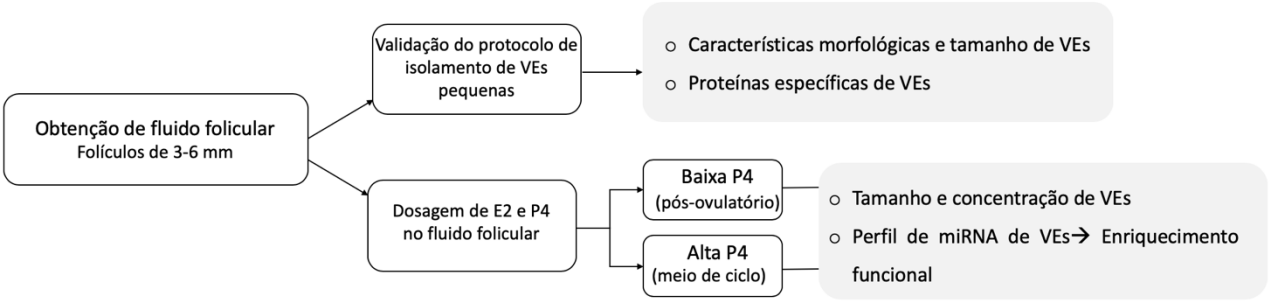
Ovários bovinos oriundos de abatedouro foram coletados em pares e classificados de acordo com a aparência do corpo lúteo em estágio 1, pós-ovulatório, e em estágio 3, em meio de ciclo estral, assim como descrito por Ireland, Murphee e Coulson (1980; Figura 5). Folículos de 3 a 6 mm de diâmetro de cada estágio foram puncionados para obtenção do FF. O FF foi submetido a centrifugações seriadas para retirada de células, debris celulares e VEs maiores e estocado a -80°C para posterior obtenção de VEs pequenas. Um total de 200μl dos *pools* de FF obtida em cada grupo foi utilizada para dosagem de E2 e P4 para confirmação dos estágios do ciclo estral (estágio 1: n=4 *pools*; estágio 3: n=5 *pools*; aproximadamente 6 ovários por *pool*). O protocolo de isolamento de VEs pequenas do FF foi validado a partir da análise de morfologia e tamanho das VEs obtidas, bem como a presença de proteínas específicas. Após confirmação dos grupos de FF de acordo com a dosagem hormonal, estes foram denominados grupos de baixa e alta concentração de P4, correspondente ao estágio 1, pós-ovulatório, e ao estágio 3, meio de ciclo estral, respectivamente. Ambos os grupos foram utilizados para isolamento de VEs pequenas. Estas vesículas foram caracterizadas quanto ao tamanho e concentração. O perfil de 383 miRNA somente maduros ou precursores e maduros isolados de VEs foi avaliado. As funções de modulação de vias biológicas por miRNAs foram analisadas a partir das análises de enriquecimento funcional por meio de bioinformática (figura 6).

Figura 5 – Imagens representando a classificação dos estágios do ciclo estral de acordo com a aparência do corpo lúteo.



Ovários de abatedouro foram coletados em pares e classificados em **(A)** fase de início de ciclo estral (pós-ovulatório; n=4 *pools*) e **(B)** fase em meio de ciclo estral (n=5 *pools*). Os folículos de 3 a 6 mm de cada estágio foram puncionados para obtenção de FF. Fonte: Própria autoria.

Figura 6 – Fluxograma referente ao estudo 1 demonstrando o processamento do fluido folicular e caracterização de VEs pequenas.



O protocolo de isolamento de VEs pequenas foi validado a partir da caracterização destas vesículas. Ainda, dois grupos de FF foram formados, ou seja, oriundos de folículos sob baixa e alta concentração de P4. As VEs pequenas destes folículos foram caracterizadas a partir da análise de tamanho e concentração, assim como perfil de miRNAs. Fonte: Própria autoria.

3.2 Estudo 2: O uso de vesículas extracelulares pequenas como suplementação na maturação in vitro de complexos cumulus-oócitos bovinos.

Hipótese:

Vesículas extracelulares pequenas oriundas de fluido folicular são internalizadas por complexos cumulus-oócitos e melhoram as taxas de produção de embriões quando suplementadas durante maturação *in vitro* de bovinos.

Objetivo Geral:

Investigar a internalização de VEs pequenas por complexos cumulus-oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* e a influência da sua suplementação nas taxas de produção de embriões *in vitro*.

Objetivos específicos:

- Analisar a dinâmica da internalização de VEs pequenas durante a maturação *in vitro* e a localização destas VEs em complexos cumulus-oócito.
- Avaliar as taxas de maturação de oócitos, de clivagem e de blastocistos produzidos *in vitro* após suplementação de VEs pequenas de fluido de folículos oriundos de momentos do ciclo estral distintos (pós-ovulatório e meio de ciclo estral) durante a maturação *in vitro*.

Justificativa:

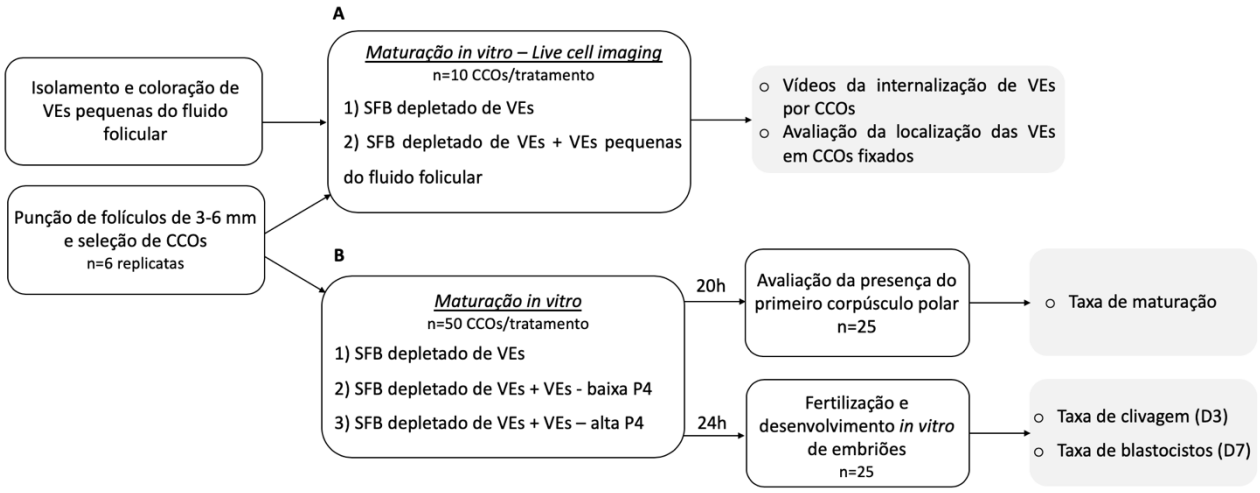
As VEs pequenas fazem parte da composição do FF e podem modular processos biológicos durante a maturação oocitária. Visto que as VEs pequenas são importantes carreadoras de material bioativo, estas podem ter a função de entrega de moléculas para diferentes compartimentos do CCO. A partir disso, é possível que VEs pequenas sejam uma importante fonte de moléculas bioativas durante a maturação *in vitro* de CCOs, os quais precisam passar por processos de maturação adequados e obter estoques de RNA suficientes para o desenvolvimento embrionário.

Desenho experimental:

Inicialmente, CCOs bovinos foram suplementados com VEs pequenas de FF marcadas com corante de membrana lipofílico para avaliação da dinâmica de internalização das VEs durante a maturação *in vitro* (n=~50 CCOs). Vídeos foram realizados (*time-lapse*) por no mínimo 9 horas de maturação *in vitro* e CCOs foram fixados nos momentos de 4, 9 e 22 horas de maturação *in* vitro para melhor avaliação da localização das VEs pequenas nos CCOs a partir de microscopia confocal. Em seguida, o efeito das VEs durante a maturação *in* vitro foi avaliado a partir da produção *in vitro* de embriões. CCOs bovinos (n=770) foram maturados *in vitro* na presença ou ausência de VEs do FF para avaliação das taxas de maturação, clivagem e blastocistos. Os tratamentos com VEs pequenas durante a maturação *in vitro* para

avaliação das taxas de produção foram divididos em 3 grupos experimentais, sendo: **1)** SFB depletado de VEs (SFB sem VEs); **2)** SFB depletado de VEs e adição de VEs do grupo baixa P4 (VEs-baixa P4) e **3)** SFB depletado de VEs e adição de VEs do grupo alta P4 (VEs- alta P4; figura 7). Foi realizado o total de 6 replicatas.

Figura 7 – Fluxograma representando experimentos do estudo 2, utilizando a suplementação de VEs durante a maturação *in vitro* para avaliação da sua internalização por complexo cumulus-oócitos e seus efeitos em taxas de produção de embriões *in* vitro.



(A) Vesículas extracelulares pequenas do FF foram isoladas e marcadas com corante de membrana. Estas VEs foram adicionadas ao meio de maturação *in vitro* onde CCOs permaneceram em incubadora acoplada ao microscópio confocal para estudo da dinâmica de internalização de VEs pelos CCOs. Adicionalmente, CCOs foram fixados para obtenção de imagens mais precisas da localização das VEs nos CCOs. **(B)** VEs pequenas obtidas de FF de diferentes estágios do ciclo estral foram adicionadas na maturação *in vitro* de CCOs bovinos. Após 20 horas de maturação CCOs (n=25/tratamento) foram desnudados em grupo e os oócitos que apresentavam extrusão do primeiro corpúsculo polar foram contabilizados (taxa de maturação). Os demais CCOs foram fertilizados *in vitro* após 24 horas de maturação *in vitro* e então, após 20-24, horas foram submetidos ao cultivo *in vitro* para avaliação de taxas de clivagem (dia 3 após fertilização) de blastocistos (dia 7 após fertilização). Fonte: Própria autoria.

3.3 Estudo 3: O impacto da suplementação de vesículas extracelulares pequenas no transporte de RNA em complexos cumulus-oócitos bovinos durante a maturação in vitro.

Hipótese:

A suplementação de VEs pequenas do fluido folicular durante a maturação *in vitro* aumenta o transporte de RNA para complexos cumulus-oócitos bovinos.

Objetivo Geral:

Determinar se a suplementação de vesículas extracelulares pequenas do fluido folicular aumenta o transporte de RNA em complexos cumulus-oócitos bovinos.

Objetivos específicos:

- Avaliar a presença de RNAs de VEs pequenas em CCOs após suplementação de VEs pequenas durante a maturação *in vitro.*
- Quantificar moléculas de RNA na região da zona pelúcida de oócitos suplementados com VEs pequenas durante a maturação *in vitro.*
- Determinar a quantidade de RNA acumulado em oócitos após suplementação de VEs pequenas durante a maturação *in vitro.*

Justificativa:

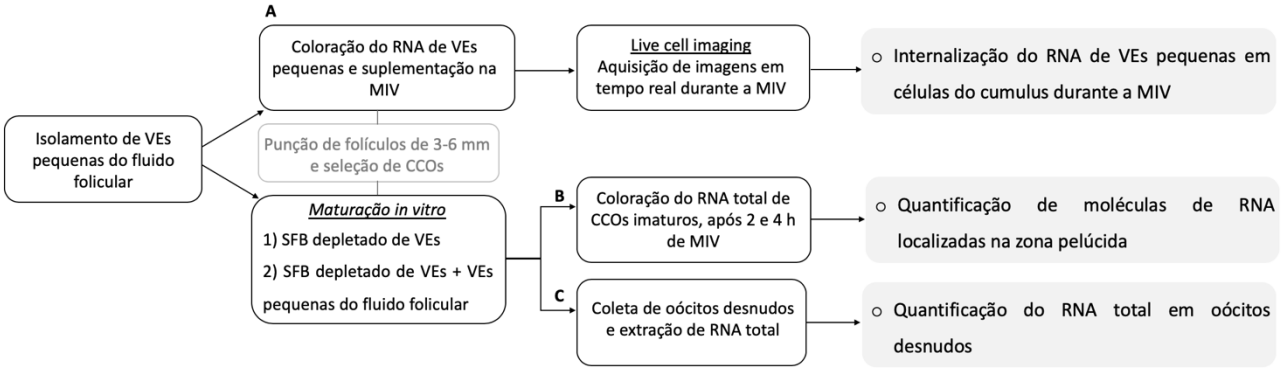
Vesículas extracelulares pequenas são internalizadas por CCOs durante a maturação *in vitro* e seu conteúdo de miRNA pode modular a via de transporte de RNA. Desta forma, é importante avaliar de que maneira a suplementação de VEs influencia o transporte de RNA no CCO. Por isso, este estudo baseia-se em diferentes técnicas para avaliar a entrada do RNA das VEs pequenas em células do cumulus e quantifica-lo na região da zona pelúcida e nos oócitos após suplementação com VEs pequenas do FF.

Desenho experimental:

Vesículas extracelulares pequenas foram isoladas do fluido de folículos de 3-6 mm de diâmetro. No primeiro experimento **(A)** o RNA total de VEs pequenas e de seu diluente (1xPBS; controle) foram corados. Ambos foram utilizados para suplementação do meio de maturação *in vitro*. As placas de cultivo foram mantidas

em incubadora monitorada por microscopia confocal (*live cell imaging*). As imagens foram utilizadas para avaliar a internalização do RNA marcado em VEs pequenas por células do cumulus (n=13 CCOs). Para os demais estudos (B e C), o meio de maturação *in vitro* foi suplementado com SFB depletado de VEs apenas ou com adição de VEs pequenas do FF. **(B)** O RNA total de CCOs imaturos e após 2 e 4 horas do início de maturação *in vitro* foi corado (n=260 CCOs). Em seguida, os oócitos desnudos foram fixados e imagens de 21 secções (1µm cada camada) desde o centro do oócito foram realizadas a partir de microscopia confocal. As marcações de RNAs localizados na região da zona pelúcida foram contabilizadas utilizando o software ImageJ. **(C)** No último experimento, após 22-24 horas de maturação, CCOs maturados na presença ou ausência de VEs pequenas oriundas de folículos expostos à alta ou baixa P4 foram desnudados e aqueles que apresentavam o primeiro corpúsculo polar foram congelados para extração de RNA total (n=90). Por fim, o RNA obtido foi quantificado utilizando o equipamento Qubit (figura 8).

Figura 8 - Fluxograma representando experimentos do estudo 3, utilizando a suplementação de VEs durante a maturação *in vitro* para quantificação de RNA em células do cumulus, zona pelúcida e oócitos.



Vesículas extracelulares pequenas foram utilizadas na suplementação do meio de maturação *in vitro.* O impacto no transporte de RNA foi avaliado em **(A)** células do cumulus, **(B)** na região da zona pelúcida e **(C)** no acúmulo de RNA no oócito desnudo. Fonte: Própria autoria.

3.4 Estudo 4: Modificações transcricionais em células do cumulus de oócitos bovinos causadas pela suplementação de vesículas extracelulares pequenas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral.

Hipótese:

A suplementação de VEs pequenas do fluido de folículos em diferentes momentos do ciclo estral (pós-ovulatório e meio de ciclo) modula, de forma distinta, transcritos nas células do cumulus de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro.*

Objetivo Geral:

Determinar modificações transcricionais causadas pela suplementação de VEs pequenas de fluido folicular de diferentes momentos do ciclo estral em células do cumulus de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro*.

Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão relativa de transcritos envolvidos nas vias de sinalização PI3K-Akt e de transporte de RNA, as quais podem ser moduladas por miRNAs encontrados nas VEs pequenas, em células do cumulus após 9 e 24 horas de maturação *in vitro*.
- Avaliar a abundância da proteína *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), fator central da via de sinalização PI3K-Akt e influenciadora da via de transporte de RNA, em células do cumulus.
- Investigar o perfil de miRNAs maduros nas células do cumulus obtidas após suplementação de VEs pequenas por 9 horas de maturação *in vitro*, considerado o momento em que inicia a perda de comunicação entre células do cumulus e oócito.
- Explorar o perfil de RNAs em células do cumulus após suplementação com VEs pequenas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral após 9 horas de maturação *in vitro*.

Justificativa:

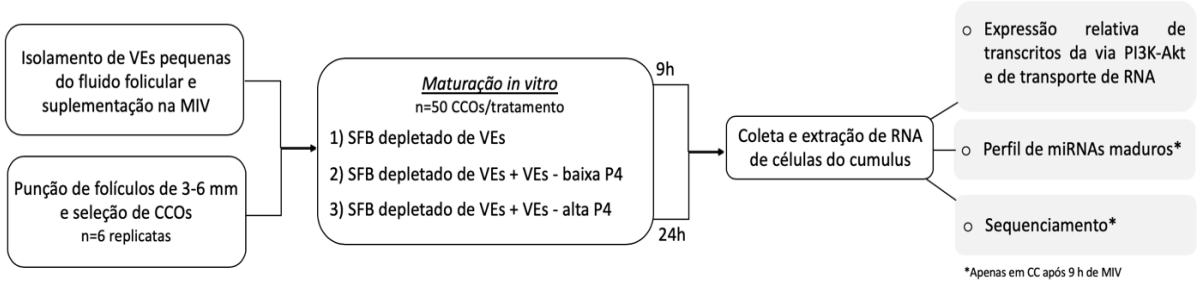
Os estudos anteriores demonstraram que as VEs pequenas são encontradas majoritariamente em células do cumulus desde o início da maturação *in vitro*. Adicionalmente, estas VEs são carreadoras de grande número de miRNAs, RNAm e

proteínas, os quais podem ser entregues aos CCOs, além de estarem envolvidos em importantes vias para maturação oocitária. Portanto, análises transcricionais em células do cumulus suplementadas com VEs podem indicar o papel das VEs durante a maturação. O momento 9 horas de maturação foi utilizado para avaliação do período em que ainda há comunicação entre células do cumulus e oócito, enquanto o momento 24 horas foi considerando visando avaliar o final da maturação *in vitro*.

Desenho experimental:

VEs pequenas foram isoladas de fluido de folículos oriundos de diferentes momentos do ciclo estral, denominados de baixa e alta concentração de P4. Estas VEs pequenas foram adicionadas aos meio de maturação *in vitro*, formando 3 grupos experimentais, sendo: **1)** SFB depletado de VEs (SFB sem VEs); **2)** SFB depletado de VEs e adição de VEs do grupo baixa P4 e **3)** SFB depletado de VEs e adição de VEs do grupo alta P4. O total de 50 CCOs oriundos de folículos pequenos (3-6 mm) foram adicionados em cada grupo experimental (n=6 replicatas). Após 9 e 24 horas de maturação *in vitro*, grupos de 25 CCOs foram desnudados para obtenção de células do cumulus. O RNA total destas células foi extraído para análises moleculares. Foram realizadas análises de expressão relativa de transcritos relacionados às vias de sinalização PI3K-Akt e de transporte de RNA nas células coletadas após 9 e 24 horas de maturação *in vitro*. A proteína PTEN, uma proteína central da via de sinalização PI3K-Akt, foi quantificada para validação de resultados encontrados a partir da modificação transcricional. O RNA das células coletadas após 9 horas de maturação *in vitro* foi utilizado para estudo do perfil de miRNAs maduros e de RNAs a partir de RT-PCR e RNAseq, respectivamente (figura 9).

Figura 9 – Fluxograma representando os experimentos do estudo 4 baseado na suplementação de VEs pequenas oriundas de folículos expostos à baixa e à alta concentração de P4 e as análises realizadas para avaliação de possíveis modificações transcricionais após 9 e 24 horas de maturação *in vitro*.



Análises do perfil de transcritos foram realizadas em células do cumulus provenientes de CCOs maturados na ausência ou presença de VEs pequenas oriundas de folículos expostos a altas e baixas concentrações de P4. Os estudos foram realizados a partir da avaliação de expressão relativa de RNAm, do perfil de miRNAs e de RNAs, utilizando RT-PCR e sequenciamento. Fonte: Própria autoria.

3.5 Estudo 5: Caracterização e uso de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino na suplementação de complexos cumulus-oócitos e espermatozoides durante a fertilização in vitro.

Hipótese:

O uso de VEs pequenas do oviduto bovino durante a fertilização *in vitro* melhora as taxas de produção e a qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Objetivo Geral:

Avaliar se a suplementação de VEs do oviduto bovino durante a fertilização *in vitro* impacta as taxas de produção e a qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro.*

Objetivos específicos:

- Caracterizar VEs pequenas de oviduto bovino de acordo com morfologia, tamanho, concentração e presença de proteínas específicas.
- Avaliar se a suplementação de VEs pequenas obtidas de oviduto em período pós-ovulatório e em meio de ciclo estral afeta as taxas de fertilização, clivagem e blastocistos produzidos *in vitro*.

- Investigar se a suplementação de VEs pequenas obtidas de oviduto bovino em período pós-ovulatório e em meio de ciclo estral influencia a expressão relativa de transcritos relacionados com qualidade embrionária em blastocistos produzidos *in vitro*.

Justificativa:

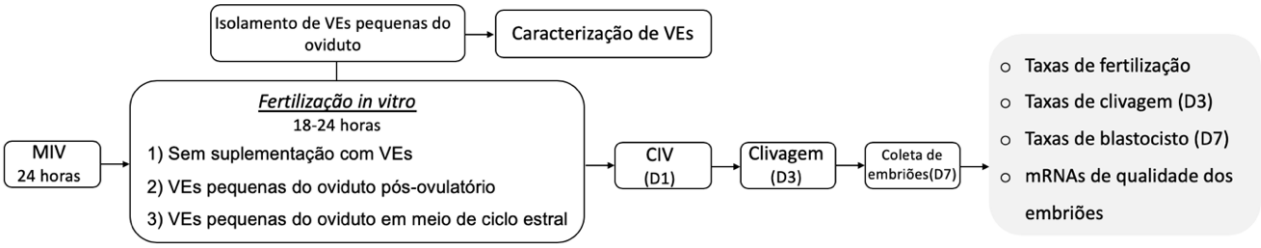
O oviduto é importante para a finalização da maturação oocitária e fertilização. Durante o ciclo estral mudanças ocorrem no oviduto podendo afetar também os gametas. O fluido do oviduto bovino contém VEs pequenas que carregam importantes moléculas. Por isso, a suplementação de VEs pequenas oriundas do fluido do oviduto pode influenciar CCOs e espermatozoides durante a fertilização *in vitro*. Neste estudo foram utilizados ovidutos em momentos distintos do ciclo estral para avaliação da importância do momento fisiológico em que ocorre a fertilização, ou seja, o momento pós-ovulatório.

Desenho experimental:

Para obtenção dos lavados de oviduto, tratos reprodutivos com presença de ovários em estágio pós-ovulatório ou em meio de ciclo estral, de acordo com a descrição de Ireland, Murphee e Coulson (1980), foram utilizados para coleta de oviduto ipsilateral ao corpo lúteo. O oviduto foi dissecado e realizado lavado do lúmen com 700µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio. O lavado do oviduto foi submetido a centrifugações seriadas para retirada de células, debris celulares e VEs maiores e estocado a -80°C para posterior obtenção de VEs pequenas. Estas VEs foram obtidas após filtragem e ultracentrifugações. Então, o protocolo de isolamento foi validado a partir da caracterização de VEs pequenas quanto à morfologia, tamanho, concentração e proteínas específicas. Para avaliação do efeito das VEs pequenas durante a fertilização CCOs bovinos (n=1177) obtidos a partir de ovários de abatedouro foram maturados *in vitro* e direcionados para cada um dos diferentes grupos de tratamento no período de fertilização *in vitro*. Para este estudo foram formados 3 grupos experimentais, sendo eles: **1)** meio de fertilização sem suplementação com VEs (controle); meio de fertilização suplementado com: **2)** VEs pequenas do oviduto pós-ovulatório, considerando o momento fisiológico da fertilização no oviduto e **3)** VEs pequenas do oviduto em meio de ciclo estral, considerado o momento não fisiológico da fertilização (n=6 repetições). Após os

procedimentos de fertilização *in vitro* e o período de incubação dos oócitos e espermatozoides, os prováveis zigotos foram coletados para avaliação da taxa de fertilização a partir da quantificação de pró-núcleos (em 16 horas de fertilização) ou transferidos para placas de cultivo (entre 18 e 24 horas de fertilização) e monitorados para a obtenção das taxas de clivagem e formação de blastocisto nos dias 3 e 7 de cultivo, respectivamente. Os embriões produzidos no dia 7 foram congelados a -80°C e o RNA extraído para análises da abundância dos níveis de transcritos relacionados à qualidade embrionária (*HSPA4, CDKN1C, CTNNBL1, OCT4, DNAJC15, BMP4, BAX* e *BCL2;* figura 10).

Figura 10 – Fluxograma representando os experimentos do estudo 5, utilizando VEs do oviduto durante a fertilização *in vitro*.



Vesículas extracelulares pequenas foram isoladas de lavado de oviduto bovino em diferentes momentos do ciclo estral (pós-ovulatório, considerado fisiológico, e meio de ciclo estral, considerado não-fisiológico). Estas VEs pequenas foram utilizadas na suplementação da fertilização *in vitro*. Então, foram avaliadas as taxas de fertilização, de clivagem e de produção de blastocistos, bem como a expressão relativa de transcritos relacionados com qualidade embrionária. Fonte: Própria autoria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento do projeto e reagentes

O estudo foi desenvolvido entre janeiro de 2017 e maio de 2019 no Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD), junto ao Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo (USP), localizado na cidade de Pirassununga, São Paulo. Este projeto possui aprovação pelo comitê de ética (Número de protocolo: 4909010817).

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) no município de Ribeirão Preto, São Paulo. As imagens de microscopia confocal foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC), situado na FMRP-USP e no Departamento de Ciências Animais na Universidade Laval, localizado na cidade de Quebec-QC, Canadá. O experimento utilizando a técnica de sequenciamento de RNA foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal, situado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP) na cidade de Piracicaba, São Paulo.

Os sais utilizados para os meios de cultivo foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes utilizados na técnica de *Western Blotting* foram adquiridos da empresa Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). Os produtos utilizados para extração de RNA e RT-PCR de miRNAs foram adquiridos da empresa Qiagen (Venlo, Limburg, Holanda). Já para as análises de expressão relativa de RNAm por RT-PCR foram utilizados reagentes da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Em casos específicos em que outros reagentes foram utilizados, os detalhes de sua origem serão citados.

4.2 Estudo 1: Caracterização de vesículas extracelulares pequenas oriundas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral bovino.

4.2.1 Coleta de fluido folicular para obtenção de vesículas extracelulares

Ovários provenientes de abatedouro foram coletados na região de Pirassununga-SP e transportados em solução salina a 36°C para o Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD – FZEA/USP), onde foram processados. Nos experimentos em que foram coletados fluidos de folículos de diferentes estágios do ciclo estral, os ovários de cada animal foram armazenados em pares imediatamente após o abate e transportados ao laboratório em sacos plásticos com solução salina. Nestes casos, as características morfológicas do corpo lúteo foram avaliadas para determinação do estágio de acordo com Ireland, Murphee e Coulson (1980). Os ovários foram lavados em solução salina aquecida e os folículos ovarianos entre 3 e 6 mm de diâmetro foram puncionados com agulha 18 G e seringa de 10 mL. O FF coletado foi processado a partir de centrifugações seriadas e armazenado a -80°C para posterior isolamento de VEs (figura 11). O fluido de folículos coletados a partir de ovários de diferentes estágios do ciclo estral foi agrupado em *pools* de 6 a 12 ovários.

4.2.2 Dosagem de estradiol e progesterona do fluido folicular

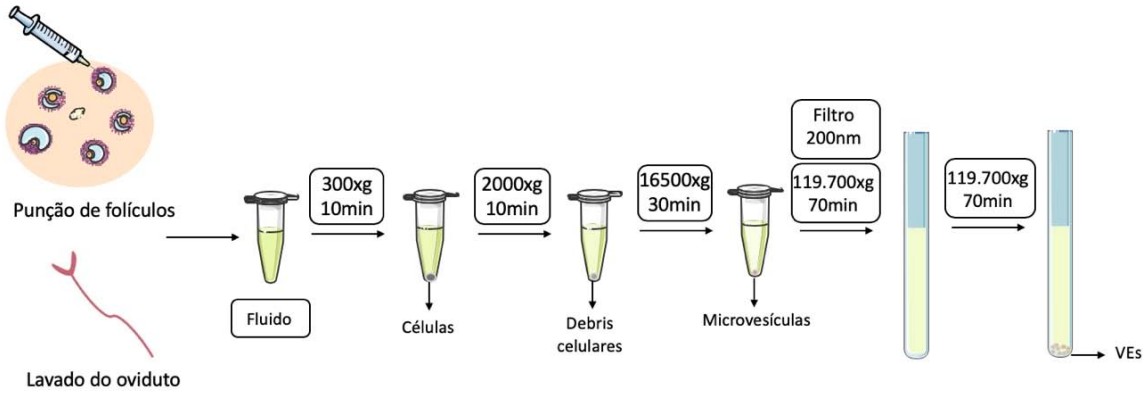
A dosagem de E2 e P4 foi realizada em fluido de folículos que foram coletados em pares para determinação de diferentes momentos do ciclo estral. Após coleta do FF foi realizada análise de concentração hormonal por quimioluminescência (ADVIA Centaur®- Siemens) pelo laboratório Pasin (Santa Maria-RS). Os coeficientes de variação intra e inter ensaio da dosagem de P4 foram 4,87 ng/mL e 9,33 ng/mL, respectivamente.

4.2.3 Isolamento de vesículas extracelulares pequenas

Vesículas extracelulares pequenas, enriquecidas em vesículas menores de 200 nm (semelhante a exossomos), foram obtidas do FF (estudos 1 a 4) e do lavado do

oviduto (estudo 5). Estes fluidos foram centrifugados a 300 xg por 10 minutos para retirada de células, 2.000 xg por 10 minutos para retirada de debris celulares, 16.500 xg por 30 minutos para retirada de VEs maiores. As centrifugações foram realizadas em temperatura de 4°C. Para obtenção de conteúdo enriquecido em VEs menores que 220 nm os fluidos foram filtrados em filtro com poro de 0,22 µm (Kasvi) e ultrancentrifugados a 119.700 xg por 70 minutos a 4°C (Optima XE-90 Ultracentrifuge; rotor 70 Ti; Beckman Coulter). Após a primeira ultracentrifugação o *pellet* foi diluído em tampão fosfato-salino (1xPBS) livre de cálcio e magnésio e ultracentrifugado novamente a 119.700 xg por 70 minutos a 4°C. O *pellet* obtido a partir da segunda centrifugação foi diluído em 50 µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio ou em meios de cultivo utilizados para cada tratamento (meio de maturação ou meio de fertilização; figura 11).

Figura 11 – Figura esquemática representando o protocolo de centrifugações seriadas para preparo de fluidos para posterior isolamento de VEs pequenas.



Imediatamente após a coleta de fluidos, estes são centrifugados progressivamente para isolamento de partículas maiores, como células, debris celulares e microvesículas. Para o isolamento de VEs pequenas o fluido é filtrado e ultracentrifugado por duas vezes, seguido de diluição em 1x PBS ou meio de cultivo. Fonte: Própria autoria.

4.2.4 Caracterização das vesículas extracelulares pequenas

As VEs pequenas isoladas do FF foram caracterizadas quanto à morfologia e tamanho por microscopia eletrônica de transmissão, presença ou ausência de proteínas específicas (ALIX e CALNEXINA) por *Western blotting* e tamanho e concentração de partículas por *Nanoparticle tracking analysis* (NTA), como descrito a seguir.

Microscopia eletrônica de transmissão

Após ultracentrifugação para obtenção do *pellet* de VEs a partir de 1 mL de FF, este foi diluído em solução fixadora (0,1M de Cacodilato; 2,5 % de Glutaraldeído; 4% de paraformaldeído; pH 7,2 a 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 2 mL de água ultrapura milli-Q para realizar uma terceira centrifugação (119.700 xg; 70 minutos; 4°C) com objetivo de retirar a solução fixadora. O *pellet* obtido foi diluído em 20 µL de água ultrapura milli-Q e mantido refrigerado até a análise desenvolvida no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O conteúdo foi colocado em grade de cobre revestida com *pioloform* por 5 minutos e o excesso foi retirado com papel de filtro úmido. Em seguida, a grade foi inserida em uma gota de 2% de acetato de uranila aquosa durante 3 minutos. O excesso foi retirado com papel filtro úmido e logo foi realizada a leitura em microscópio eletrônico de transmissão (FEI 200kV, modelo Tecnai 20, emissor LAB6).

Western blotting

O *pellet* de VEs obtido a partir de 0,5 mL de FF foi diluído em 50 µL de tampão de lise contendo inibidor de protease (RIPA). Em 10 µL foi adicionada solução de Laemmli e 2-mercaptoethanol 4x (Bio-Rad), em seguida as amostras foram submetidas a 95°C durante 5 minutos para desnaturar as proteínas e centrifugadas a 10.000 rpm durante 1 minuto. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE poliacrilamida 10% (456-1033, Mini-PROTEAN TGX, Bio-rad), o qual foi mantido em câmara com tampão de corrida Tris/Glicina/SDS 1x (161-0772, Bio-rad). A corrida foi realizada a 100 V durante aproximadamente 90 minutos e então foi realizada transferência semi-seca para membrana de PVDF (1704156, Trans-Blot Turbo, Bio-rad). Após transferência a membrana foi lavada em *Tris buffered saline* com Tween-20 (100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 50 mM Tris, pH 7.4; 1XTBST) e mantida por 1 hora em solução de bloqueio (5% de BSA, albumina sérica bovina, em 1xTBST). Em seguida, a membrana foi retirada do bloqueio e incubada com anticorpos primários overnight a 4°C. As proteínas estudadas foram ALIX e CALNEXINA a partir dos anticorpos policlonal de cabra contra um peptídeo do N-terminal da ALIX de origem humana (1:1000, #SC-49267, Santa Cruz, CA, USA) e monoclonal de camundongo

contra linhagem celular de hepatoma humano (1:400, #SC-23954, Santa Cruz, CA, USA), respectivamente. Após o período de incubação a membrana foi lavada três vezes 1XTBST durante 5 minutos e mantida durante 1 hora em anticorpo secundário anti-cabra (1:4000, SC-2020, Santa Cruz) e anti-camundongo (1:4000, #7076S, Cell Signaling Technology) conjugados a HRP (*horseradish peroxidase*). Por fim, foram retirados os anticorpos secundários, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos em 1XTBST e exposta à solução de detecção (170-5060, Clarity Western ECL) e análise realizada pelo aparelho ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Nanoparticle tracking analysis

Vesículas extracelulares pequenas isoladas a partir de 100µL de FF foram diluídas em 50 µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio para avaliação de tamanho e concentração de partículas com auxílio do aparelho Nanosight (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern). O fator de diluição utilizado para leitura foi de 1:500 em 1xPBS livre de cálcio e magnésio. Foram realizados 5 vídeos de 30 segundos em cada amostra analisada, capturados pela câmera sCMOS em *Camera Level* 15 e temperatura controlada a 37 °C. As análises foram realizadas considerando *threshold* 5.

4.2.5 Extração de RNAs de vesículas extracelulares pequenas e transcrição reversa

O conteúdo de RNAs das VEs pequenas, incluindo miRNAs, foi extraído utilizando o kit comercial miRNeasy Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções da empresa. A quantidade e qualidade do RNA foi analisada por espectrometria (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). Para obtenção do cDNA de miRNAs foi realizada transcrição reversa utilizando kit comercial miScript II RT Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções da empresa. Para obter miRNAs apenas maduros foi utilizado *miScript HiSpec Bufffer* e para precursores e maduros foi utilizado *miScript HiFlex Buffer*. Foi realizada reação de 10 µL contendo 100 ng de RNA total. Esta reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador (Life Technology) a 37 °C por 60 minutos, seguido de 95 °C por 5 minutos.

4.2.6 Análises de expressão relativa dos miRNAs por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time – PCR)

A avaliação dos níveis de expressão relativa de 383 miRNAs em VEs pequenas de fluido de folículos em diferentes momentos do ciclo estral foi realizada a partir da técnica de RT-PCR quantitativo, utilizando o kit miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções da empresa. Foram feitas reações de 6 µL contendo 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10X miScript Universal Primer, RNase free-water, 0,2 ng de cDNA e 10X miScript Primer Assay, desenhados de acordo com as sequências de miRNAs maduros disponíveis no software mirBase (http://www.mirbase.org). As amplificações foram realizadas no equipamento QuantStudio 6 Flex (Life Technology). As temperaturas e tempos utilizados foram 95 °C por 15 minutos para ativação da *HotStarTaq DNA Polymerase* e início da desnaturação das fitas de cDNA seguido de 45 ciclos de 94 °C por 15 segundos para desnaturação, 55 °C por 30 segundos para anelamento dos primers e 70 °C por 30 segundos para extensão, quando ocorre a captação da fluorescência. Os miRNAs foram considerados presentes quando apresentaram *cycle threshold* (CT) menor que 37 em pelo menos três repetições biológicas e curva de *melting* apropriada. Os dados de CT gerados pela amplificação foram normalizando utilizando um gene endógeno (bta-miR-99b) em duplicata técnica, como previamente utilizado por Da Silveira e colaboradores (2017).

4.2.7 Análises de miRNAs maduros e precursores

Os miRNAs das VEs de fluido de folículos expostos à baixa e à alta concentração de P4 foram considerados presentes apenas quando observados em pelo menos três amostras do mesmo grupo. Estes foram avaliados quanto à repetibilidade dentro de cada grupo. As médias de expressão relativa de cada miRNA dos diferentes grupos foram comparadas utilizando *Student's T test* considerando 5% de probabilidade e os miRNAs diferentes entre os grupos foram verificados se estavam mais ou menos abundantes em cada grupo. Os miRNAs diferentes entre os grupos e que apresentaram pelo menos 90% de homologia com humanos foram submetidos a análises de bioinformática, utilizando o software mirPath v.3 na

plataforma DIANA TOOLS e as bases de dados TarBase (v7.0 http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr).

4.3 Estudo 2: O uso de vesículas extracelulares pequenas como suplementação na maturação in vitro de complexos cumulus-oócitos bovinos.

4.3.1 Coloração de vesículas extracelulares pequenas e suplementação do meio de maturação in vitro

Vesículas extracelulares pequenas foram isoladas de 1 mL de FF, independente do estágio do ciclo estral, e diluídas em 30 µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio. Para marcação da membrana destas VEs foram utilizados os corantes PKH26 (vermelho; MINI26; Sigma-Aldrich) ou PKH67 (verde; MINI67; Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções da empresa. Resumidamente, foi adicionado 250 µL de diluente C nas soluções contendo VEs ou apenas 1xPBS livre de cálcio e magnésio (controle). Imediatamente foi adicionado 250 µL de diluente C contendo 1 µL de corante (PKH26 ou PKH67). Esta solução foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 1mL de meio TCM199 (GIBCO) contendo 1% de BSA durante 1 minuto a temperatura ambiente para inativação do corante livre na solução. Por fim, a solução foi centrifugada por duas vezes a 100.000xg por 30 minutos a 4°C para recuperação das VEs pequenas coradas, como descrito por Almiñana et al. (2017). As VEs pequenas obtidas e o *pellet* obtido do controle foram diluídos em 1 mL de meio de maturação, o qual foi utilizado para maturação *in vitro* de CCOs e análise da internalização de VEs coradas a partir de microscopia confocal utilizando o sistema *live cell imaging*.

4.3.2 Análise da internalização de vesículas extracelulares pequenas por complexos cumulus-oócitos durante a maturação in vitro

Para analisar a interação entre CCOs e VEs pequenas coradas foram realizadas imagens em tempo real (*live cell imaging*) de CCOs não fixados durante no mínimo 9 horas de maturação *in vitro*. Neste estudo o total de 50 CCOs semi-desnudos foram incubados em 500 µL de meio de maturação (n~10 CCOs/replicata) contendo Sir-Actin (0,1µM; CY-SC001; Cytoskeleton), para coloração de actina, e VEs

coradas com corante de membrana ou com solução controle (sem VEs pequenas). Os CCOs foram mantidos em placas customizadas (modificadas da Bioptechs #190310-35), contendo 60 poços com 280 µm de diâmetro, sob óleo mineral. A placa foi mantida na incubadora do microscópio a 38,5 °C em atmosfera umidificada e com 5% de CO_2. As imagens foram adquiridas a partir de 20 séries de *time-lapses* durante intervalo de 10 segundos utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 700 (*Confocal live cell system*; Carl Zeiss) desde a primeira hora de maturação *in vitro*, em objetiva 40x/1.2NA sob óleo (Immerson W.). Em cada série de imagens (*time-lapse*) foram avaliadas 5 secções dos CCOs (*z-stack*), contendo espessura de 1µm cada. Ao final da maturação (20-24 horas) CCOs foram fixados em paraformaldeído 4% (PFA 4%) para análises detalhadas da localização das VEs pequenas em diferentes compartimentos do CCO, como células do cumulus, TZPs e ooplasma. Seis replicatas das imagens em tempo real foram realizadas.

Adicionalmente, para análise detalhada da localização de VEs pequenas nos compartimentos dos CCOs no início da maturação *in vitro*, 30 CCOs semi-desnudos foram maturados em 90 µL de meio contendo VEs marcados com corantes de membrana ou apenas o diluente marcado (controle). Estes CCOs foram coletados após 4 e 9 horas de maturação *in vitro*, lavados em 1xPBS livre de cálcio e magnésio e fixados com PFA 4% por 15 minutos. O DNA e os filamentos de actina dos CCOs foram corados utilizando Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) por 25 minutos e Alexa Fluor 647 phalloidin (Invitrogen) por 30 minutos, respectivamente. Por fim, os CCOs foram lavados em 1xPBS livre de cálcio e magnésio e foram dispostos entre lâmina de vidro e lamínula com o reagente ProLong Antifade (ThermoFisher). As imagens foram realizadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica), em objetivas de 40x/1.2NA e 63x/1.2NA, ambas sob óleo mineral.

4.3.3 Produção in vitro de embriões bovinos

Complexos cumulus-oócitos bovinos foram obtidos de ovários de abatedouro na região de Pirassununga-SP e transportados ao LMMD em solução salina a 36°C. Após lavar os ovários em solução salina aquecida os folículos ovarianos entre 3-6 mm foram puncionados com agulha 18 G e seringa de 10 mL. O FF obtido foi mantido em repouso para decantar os CCOs, os quais foram selecionados em graus I, II e III de

acordo com a característica de células do cumulus e ooplasma (LEIBFRIED; FIRST, 1979).

Após seleção, os CCOs de graus I e II, ou seja, com ooplasma homogêneo e cumulus compacto, foram lavados em meio TCM 199 (GIBCO) com tampão HEPES (20 mM), bicarbonato de sódio (5 mM) e adição de piruvato de sódio (0,2 mM) e gentamicina (50 µg/mL). Em seguida, os CCOs foram lavados em meio de maturação TCM 199 (GIBCO) com 25mM de bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de SFB (Cripion Biotecnologia, Andradina, SP, Brasil) depletado de VEs a partir de centrifugação (120.000xg, 14 horas), piruvato de sódio (0,2 mM), gentamicina (50 µg/mL), hormônio folículo estimulante (FSH; 1 µg/mL; Folltropin-V; Bioniche Animal Health Belleville, Canada) e gonadotrofina coriônica humana (hcG; 50 µg/ mL; Vetecor, Hertape Calier). Grupos de 20 a 25 CCOs foram distribuídos em gotas de 90 µL deste mesmo meio de maturação em placas de 35 mm (Corning) sob óleo mineral estéril (Sigma – Aldrich) em incubadora a 38,5°C, 5% de CO_2 em ar atmosférico e umidade controlada durante 22 a 24 horas. Neste estudo, VEs pequenas oriundas de 200µL de fluido de folículos dos grupos baixa e alta P4 foram isoladas e diluídas em 200µL de meio de maturação e utilizadas como suplementação durante a maturação *in vitro*.

Um grupo de CCOs (n=20 a 25/tratamento) foi desnudado após 20 horas de maturação *in vitro* para contagem de extrusão de corpúsculo polar e avaliação de taxa de maturação. Os demais CCOs (n=20 a 25/tratamento) seguiram para produção de embriões *in* vitro. A fertilização *in vitro* dos CCOs foi realizada após maturação, quando estes foram lavados em meio FIV constituído por de TL-Stock, gentamicina (50 µg/mL), piruvato de sódio (0,2 mM), PHE (18 mM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de epinefrina), Heparina (10 µg/mL) e BSA (6 mg/mL) e mantidos em gotas de 90 µL deste mesmo meio. O sêmen de um único touro da raça nelore (IAOP-CRV Lagoa) foi descongelado em água a 36°C por 30 segundos e depositado em gradiente de Percoll 45% e 90%. Este gradiente foi centrifugado a 4.500 rpm por 7 minutos, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* de espermatozoides viáveis diluído em 500 µL de meio FIV. O sêmen foi centrifugado novamente a 2.500 rpm por 5 minutos para lavagem e, por fim, o *pellet* diluído em 30 µL de meio FIV. Este *pellet* foi avaliado quanto à motilidade e concentração para obtenção da diluição adequada para atingir aproximadamente 5 mil espermatozoides por CCO. O total de 6 µL do meio contendo espermatozoides foi adicionado às gotas de fertilização *in vitro*

submersas à óleo mineral que possuíam os CCOs. As placas foram mantidas durante 18 a 24 horas em incubadora a 38,5°C, 5% de CO2 em ar atmosférico e umidade controlada.

Após período de fertilização, os prováveis zigotos foram desnudados por meio de pipetagens para retirada de células do cumulus em meio TL-sêmen suplementado com piruvato de sódio (0,2 mM) e gentamicina (50 µg/mL) e lavado em meio SOFaa (fluido sintético do oviduto acrescido de aminoácidos) suplementado com piruvato de sódio (0.2 mM), gentamicina (50 µg/mL), 6 mg/mL de BSA e 2,5% de SFB depletado de VEs. Grupos de 20 a 25 zigotos foram mantidos em gotas de 90 µL submersas em óleo mineral em incubadora a 38,5°C, 5% de CO2, 5% de O2 e umidade controlada durante 7 dias. No terceiro dia de cultivo foi realizado o *feeding*, quando 50% do meio foi substituído por meio SOFaa fresco e as estruturas que clivaram foram contabilizadas. No sétimo dia os blastocistos foram contabilizados, coletados, congelados em nitrogênio e mantidos a -80°C para posteriores análises moleculares.

4.4 Estudo 3: O impacto da suplementação de vesículas extracelulares pequenas no transporte de RNA em complexos cumulus-oócitos bovinos durante a maturação in vitro.

4.4.1 Coloração do RNA de vesículas extracelulares pequenas do fluido folicular e avaliação da internalização por células do cumulus

O RNA total de VEs oriundas de 1mL de FF, independente do estágio do ciclo estral, foi corado para análise da entrega de RNAs para CCOs. Para isso, VEs pequenas foram diluídas em 100 µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio e o RNA foi marcado com o corante SYTO RNA Select (S32703; Thermo Fisher), de acordo com o protocolo da empresa para coloração de vesículas (Application note: "*Labeling exosomal RNA and membrane componentes using fluorescente dyes*"; Life Technologies). Resumidamente, 1 µL do corante (1mM) foi adicionado à solução contendo VEs pequenas ou apenas 1xPBS livre de cálcio e magnésio (controle). Então, a solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Por fim, o corante livre foi retirado utilizando colunas específicas (Exosome Spin Columns, MW3000; Invitrogen), de acordo com as instruções da empresa. Em suma, a coluna foi hidratada com 650µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio, seguida de centrifugação a 750 xg por 2 minutos

a temperatura ambiente para retirar o excesso do diluente. Então, as soluções de VEs pequenas e controle foram adicionadas em colunas, as quais foram centrifugadas a 750 xg por 2 minutos a temperatura ambiente para recuperação de VEs pequenas coradas ou o meio da solução controle. Finalmente, a solução final foi diluída em meio de maturação, o qual foi utilizado para maturação *in vitro* de CCOs e análise da internalização do RNA total de VEs pequenas utilizando microscopia confocal (*live cell imaging)*.

Para realização deste experimento, imagens em tempo real demonstrando a internalização de VEs pequenas contendo o RNA marcado foram realizadas assim como descrito no item 4.3.2. Em resumo, 13 CCOs semi-desnudos foram maturados *in vitro* em meio contendo VEs pequenas com o RNA marcado ou apenas o diluente após o mesmo processo de coloração (n=10; controle), ambos com Sir-actin (0,1µM; número de catálogo CY-SC001; Cytoskeleton) para coloração de actina. Os vídeos adquiridos tiveram as mesmas configurações quando os CCOs foram incubados com VEs pequenas em que a membrana havia sido marcada.

4.4.2. Coloração e quantificação do RNA total na zona pelúcida de oócitos

O RNA de CCOs imaturos e maturados em meio suplementado com VEs pequenas do FF ou sem suplementação (n=10 CCOs/grupo) foi marcado utilizando o corante SYTO RNA Select (0,05nM; S32703; Thermo Fisher), utilizando protocolo adaptado, como descrito por Macaulay et al. (2016). Em resumo, os CCOs foram mantidos em meio TCM199 com tampão HEPES (GIBCO) e corante (1:1000) por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, os CCOs foram desnudados gentilmente por meio de pipetagens. Os oócitos desnudos foram fixados em PFA 4% por 15 minutos, seguido de lavagem em 1xPBS. Um grupo de oócitos não foi corado (controle; n=5/hora), com o objetivo de avaliar o *background* no momento da análise por microscopia confocal. Filamentos de actina foram corados em todos os grupos utilizando o corante Sir-Actin (1µM; CY-SC001; Cytoskeleton) por 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, os oócitos foram lavados em 1xPBS e colocados entre lâmina de vidro e lamínula para análise em microscopia confocal. O total de 21 secções dos oócitos (*z-stack*) foram registradas, cada uma contendo 1µm de intervalo, partindo do centro do oócito. As imagens foram realizadas em microscópio confocal (Zeiss LSM 700 *confocal live cell system*; Carl Zeiss) em objetiva 40x/1.2NA. Moléculas de RNA localizadas na zona

pelúcida foram contabilizadas em cada secção, a partir do programa ImageJ (método MaxEntropy), levando em conta o tamanho e intensidade das marcações. Seis replicatas foram realizadas.

4.4.3 Quantificação do RNA total em oócitos desnudos

O RNA total acumulado no oócito foi avaliado após a etapa de maturação *in vitro*. Inicialmente, CCOs foram maturados *in vitro* (n=50/tratamento) na presença de apenas SFB sem VEs ou suplementados com VEs expostas à baixa ou alta P4. Após 22-24 horas de maturação os CCOs foram totalmente desnudados a partir de pipetagens. Os oócitos que apresentavam extrusão do primeiro corpúsculo polar foram lavados em 1xPBS e congelados a -80°C em grupos de 10 oócitos/tratamento. Então, três grupos de cada tratamento foram utilizados para extração de RNA de acordo com protocolo do Trizol® (Thermo Fisher) com adição do coprecipitante GlycoBlue® (ThermoFisher). O pellet de RNA foi diluído em 10µL de água livre de RNase e DNase e então foi realizado tratamento com DNAse I (ThermoFisher), de acordo com as instruções da empresa. Por fim, a quantificação do RNA total foi realizada utilizando o Qubit RNA HS Assay Kit (Q32852; ThermoFisher). Em resumo, a solução de trabalho (*work solution*) foi preparada utilizando o reagente Qubit RNA HS e Qubit RNA HS *buffer* (1:200). Em seguida, foi adicionado 10 µL da solução padrão ou 2 µL de amostra de RNA dos oócitos em 190 µL e 198 µL da solução de trabalho, respectivamente. As soluções foram homogeneizadas em vortex e mantidas a temperatura ambiente por 2 minutos. Após mensuração das soluções padrão no Fluorímetro Qubit 2.0 (ThermoFisher), cada amostra contendo RNA foi mensurada por três vezes. A média das três medidas foi utilizada para determinar a concentração de RNA em ng/µL utilizando os cálculos indicados no protocolo do kit.

4.5 Estudo 4: Modificações transcricionais em células do cumulus de oócitos bovinos causadas pela suplementação de vesículas extracelulares pequenas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral.

4.5.1 Coleta de células do cumulus

Grupos de 20 a 25 CCOs maturados *in vitro* na presença ou ausência de VEs pequenas foram totalmente desnudados após 9 e 24 horas de maturação a partir de

pipetagens em 1xPBS livre de cálcio e magnésio para estudo dos efeitos transcricionais do tratamento com VEs pequenas. As células do cumulus obtidas foram centrifugadas duas vezes a 300 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As células do cumulus remanescentes nos oócitos foram retiradas com auxílio de *stripper pipet* (Origio) e quando completamente desnudos foram lavados em 1xPBS livre de cálcio e magnésio e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas à -80°C para posteriores análises moleculares.

4.5.2 Extração de RNA de células do cumulus e transcrição reversa

O conteúdo de RNAs das células do cumulus, incluindo miRNAs, foi extraído utilizando o kit comercial *miRNeasy Mini Kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções da empresa. O RNA extraído foi tratado com o kit DNAse I (ThermoFisher). A quantidade e qualidade do RNA foi analisada por espectrometria (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific).

Para estudo de expressão relativa de RNAm nas células do cumulus, o RNAm foi convertido em cDNA. Este foi obtido utilizando o *kit High Capacity* (Thermo Fisher) de acordo com as instruções da empresa. A reação de transcrição reversa contendo 20 µL totais foi realizada em termociclador (Life Technology) a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

Para obtenção do cDNA de miRNAs foi realizada transcrição reversa utilizando kit comercial miScript II RT Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções da empresa, utilizando *miScript HiSpec Bufffer* para obtenção de miRNAs na forma madura. Foi realizada reação de 10 µL contendo 100 ng de RNA total. Esta reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador (Life Technology) a 37 °C por 60 minutos, seguido de 95 °C por 5 minutos. Por fim, as amostras de cDNA foram utilizadas imediatamente para os procedimentos de RT-PCR.

4.5.3 Análises de expressão relativa dos RNAm e miRNAs por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time – PCR)

Os níveis de expressão relativa dos RNAm foram avaliados pela técnica de RT-PCR quantitativo a partir da utilização do kit SYBR Green RT-PCR Master Mix

(Thermo Fisher) de acordo com as instruções da empresa. Foram feitas reações de 10 µL contendo 2x SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,5 µM de primer *forward* e *reverse* (apêndice A), amostra (cDNA) e água livre de RNAse e DNAse (variável). As amplificações foram realizadas no equipamento QuantStudio 6 Flex (Life Technology). As temperaturas e tempos utilizados foram 95 °C por 10 minutos para ativação da enzima DNA *Polymerase* e início da desnaturação das fitas de cDNA seguido de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação e 60 °C por 1 minuto para anelamento dos primers e extensão, quando ocorre a captação da fluorescência. Por fim, foram feitas análises da curva de *melting* para avaliar a presença de um único produto. As temperaturas para obtenção da curva foram 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos novamente. Os RNAm foram considerados presentes quando apresentaram CT menor que 37 e curvas de *melting* apropriadas, ou seja, representando apenas amplificação de um produto. Os dados de CT gerados pela amplificação foram normalizados utilizando a média geométrica de dois genes endógenos (*PPIA e YWAHZ*). A eficiência dos *primers* foi testada anteriormente, sendo utilizados aqueles com eficiência entre 90 e 110%, para avaliação da funcionalidade dos *primers* e melhor concentração das amostras a ser utilizadas nas reações.

Os níveis de expressão relativa de 383 miRNAs maduros avaliados nas células do cumulus após 9 horas de maturação e expostas a diferentes suplementações foram realizados a partir da técnica de RT-PCR quantitativo, utilizando o kit miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções da empresa, assim como descrito no item 4.2.6. Foram avaliados os perfis de miRNAs de 4 amostras por grupo experimental. Os miRNAs foram considerados presentes no grupo quando o CT menor que 37 e curva de *melting* adequada foram considerados em pelo menos 3 amostras. Em seguida, os alvos dos miRNAs diferentes entre os grupos foram avaliados utilizando o software Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_72/).

4.5.4 Abundância da proteína PTEN em células do cumulus

Para quantificação da proteína PTEN nas células do cumulus suplementadas com VEs pequenas dos grupos alta e baixa P4 ou sem VEs durante 9 horas de maturação *in vitro* foi realizada a técnica de *western blotting*. As proteínas foram purificadas a partir da fração orgânica após extração de RNA com Trizol®

(ThermoFisher). Em suma, as proteínas foram precipitadas utilizando 900 µL de isopropanol, seguido de centrifugação a 12.000 xg por 10 minutos. O *pellet* de proteínas obtido foi lavado três vezes com 0,3M de Cloridrato de Guanidina (G3272-100G; Sigma Aldrich) diluído em 95% de etanol, a partir de centrifugações de 12.000 xg por 10 minutos. Ao final, o *pellet* foi diluído em 8M de ureia (US75826; USB).

A técnica de *western blotting* foi realizada como descrito no item 4.2.4, com modificações. Em suma, as amostras (~5 a 10 µg de proteína) foram aplicadas em gel de SDS-Poliacrilamida 12%, seguido por corrida a 100 V por aproximadamente 150 minutos. Após, foi realizada transferência líquida das proteínas para membrana de nitrocelulose a 80 V por 120 minutos. Em seguida, a membrana foi mantida em solução de bloqueio (5% BSA em 1x TBST) por 1 hora a temperatura ambiente, seguida de incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-PTEN de origem humana (1:500, #SC7974, Santa Cruz). Após incubação, a membrana foi lavada três vezes em solução 1XTBST por 5 minutos e foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-camundongo (1:4000, #7076S, Cell Signaling Technology) a temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi lavada três vezes em 1XTBST e submetidas a reação de quimioluminescência e captação das bandas.

Adicionalmente, após revelar a membrana para detecção da proteína PTEN, a mesma membrana foi lavada três vezes em 1xTBST e bloqueada por 1 hora em solução de bloqueio. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo monclonal anti-beta-actina (ACTB; A3854; Sigma-Aldrich), já conjugado a HRP, por 3 horas a temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi lavada três vezes com 1xTBST e tratada com substrato Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad) para detectar a proteína marcada. A razão de PTEN e ACTB foi utilizada para quantificar a proteína PTEN nas células do cumulus.

4.5.5 Sequenciamento de RNA de células do cumulus

O perfil de RNA de células do cumulus coletadas de grupos de CCOs maturados *in vitro* por 9 horas com VEs do grupo baixa ou alta P4 ou sem VEs foi avaliado a partir da técnica de sequenciamento. Para isto, o RNA extraído de três grupos de células de cada grupo experimental foi analisado a partir do *kit Agilent RNA 6000 Nano kit*. As bibliotecas foram preparadas com o *kit truseq stranded mRNA sample prep* e o

sequenciamento foi feito em uma *lane* do Hiseq 2500 V4 (2x100pb). Os dados foram processados no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo (FMRP-USP). A qualidade de leituras foi avaliada pelo software FASTQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). As leituras foram filtradas com o software TRIMMOMATIC (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), utilizando os parâmetros " *threads 24 LEADING: 22 TRAILING: 22 SLIDINGWINDOW: 4: 26 MINLEN: 36 AVGQUAL: 24*"; considerando o mínimo de 22 phred de qualidade, no início/ final da leitura, média de 22 phred de qualidade e tamanho mínimo da leitura de 36 pares de bases. As leituras que passaram pela triagem de qualidade foram alinhadas com o genoma de *Bos taurus* ("*assembly* ARS-UCD1.2"), utilizando parâmetros padrões do software STAR (DOBIN et al., 2013) e uma análise final da qualidade do alinhamento foi criada utilizando o software MULTIQC (EWELS; LUNDIN; MAX, 2016). A análise dos genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando o pacote do R DESEQ2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), considerando o método Benjamini-Hochberg ("BH"), valor de p-ajustado <0,1 e l*og2 fold change* maior que 0,5 ou menor que -0,5. Ademais, considerando os três grupos analisados, os genes foram classificados em aumentados ou diminuídos em um grupo se eles estiveram sempre aumentados ou diminuídos em todos os contrastes possíveis. Para a análise de enriquecimento foi utilizado o pacote "ClusterProfilter" no software R (YU et al., 2012) com a função *compareCluster* e a *flag* "enrichGO" para processos biológicos. Para auxiliar na interpretação dos resultados, as imagens de análise de componentes principais (PCA) e *Volcano plots* foram construídas utilizando o software R.

4.6 Estudo 5: Caracterização e uso de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino na suplementação de complexos cumulus-oócitos e espermatozoides durante a fertilização in vitro.

4.6.1 Coleta de lavado do oviduto e caracterização de vesículas extracelulares pequenas

Tratos reprodutivos bovinos característicos do período pós-ovulatório e de meio de ciclo estral de acordo com a aparência do corpo lúteo, como descrito por Ireland,

Murphee e Coulson (1980), foram coletados em abatedouro e transportados em solução salina a 36°C para o Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento (LMMD – FZEA/USP). Após lavar o trato reprodutivo com solução salina aquecida, os ovidutos ipsilaterais ao corpo lúteo foram dissecados com auxílio de tesouras estéreis, lavados três vezes em álcool 70% e em 1xPBS livre de cálcio e magnésio com adição de 1% de PSA (Penicilina-Estreptomicina). O lúmen de cada oviduto foi lavado com 700 µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio e auxílio de pipeta e ponteira de 1mL desde o infundíbulo até o istmo, seguido de massagem para retirada do líquido em microtubo de 1,5 mL. O fluido coletado foi imediatamente centrifugado para retirada de partículas maiores, como descrito anteriormente na seção 4.2.3. Por fim, os fluidos centrifugados foram mantidos a -80° C até o momento do isolamento de VEs pequenas, assim como descrito no item 4.2.3. As vesículas extracelulares obtidas de 700 µL foram caracterizadas quanto à morfologia e ao tamanho por microscopia eletrônica de transmissão, tamanho e concentração de partículas por NTA e presença de proteínas específicas por *Western blotting*, assim como descrito no item 4.5.4. Em especial, o anticorpo primário policlonal de cabra anti-citocromo C de origem humana (SC8385; 1:1000) foi utilizado como controle negativo para as VEs pequenas do oviduto. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-cabra (1:4000, #SC-2020, Santa Cruz).

4.6.2 Produção in *vitro* de embriões bovinos

A produção de embriões *in vitro* foi realizada como descrita do item 4.3.3, com pequenas modificações. Neste estudo foram utilizadas VEs pequenas como suplementação apenas durante a fertilização *in vitro*. Em suma, a maturação *in vitro* foi realizada com SFB depletado de VEs para todos os grupos experimentais (n=10 CCOs/ gota de 90 µL) durante 24 horas. VEs pequenas oriundas de 700µL de fluido de ovidutos foram diluídas em 700 µL do meio de fertilização. Após a maturação dos CCOs (n=1177), estes foram distribuídos em diferentes tratamentos durante a fertilização *in vitro*, sendo **1)** Controle (sem adição de VEs); **2)** VEs pequenas do estágio pós-ovulatório ou **3)** VEs pequenas do estágio de meio de ciclo estral. A fertilização foi realizada utilizando um único touro da raça Nelore (Dominio – CRV Lagoa). Então, para avaliação da taxa de fertilização, após 16 horas de fertilização o total de 20 a 30 prováveis zigotos foram desnudados em 1xPBS, fixados em PFA 4%

por 15 minutos e foram mantidos entre lâmina de vidro e lamínula com Hoechst 33342 e glicerol para coloração do material genético. Em seguida, as lâminas foram avaliadas em microscópio de fluorescência, e contabilizados os oócitos com presença de dois pró-núcleos (n=5 repetições). Após 20-24 horas de fertilização *in vitro*, os demais prováveis zigotos (n=~ 40/grupo) foram mantidos em cultivo durante 7 dias em meio de cultivo sem SFB e na presença de BSA (8 mg/ml), quando foram avaliadas taxas de clivagem no dia 3 e taxas de blastocistos no dia 7 de cultivo (n= 6 repetições). Os blastocistos desde estágio inicial até eclodidos foram coletados no dia 7 de cultivo, lavados em 1xPBS livre de cálcio e magnésio e congelados em grupos de 5 embriões a -80°C para demais análises moleculares. Em especial, todas as etapas deste experimento foram realizadas em baixa tensão de oxigênio (90% Nitrogênio, 5% O_2 e 5% de CO_2), com objetivo de aproximar às condições do ambiente *in vivo.*

4.6.3 Extração de RNA e transcrição reversa de embriões

Os embriões em todos os estágios de blastocistos coletados no dia 7 de cultivo em diferentes rotinas foram agrupados para formarem grupos de 10 embriões. Ao final, três grupos de cada tratamento foram utilizados para extração de RNA de acordo com protocolo do Trizol® (Thermo Fisher) com adição do coprecipitante GlycoBlue® (Thermo Fisher). O pellet de RNA foi diluído em 10µL de água livre de RNase e DNase e então foi realizado tratamento com DNAse I (ThermoFisher), de acordo com as instruções da empresa. A quantidade e qualidade do RNA extraído foram avaliadas a partir de espectrometria (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific).

A transcrição reversa do RNA em cDNA foi obtida utilizando o kit High Capacity (Thermo Fisher) de acordo com as instruções da empresa. A reação contendo 20 µL totais foi realizada em termociclador (Life Technology) a 25 °C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Por fim, as amostras de cDNA foram utilizadas imediatamente para os procedimentos de RT-PCR.

4.6.4 Análises de expressão relativa de RNAm por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time – PCR)

A expressão relativa de transcritos relacionados à qualidade embrionária foi avaliada nos embriões produzidos *in vitro* (*HSPA4, CDKN1C, CTNNBL1, OCT4,*

DNAJC15, BMP4, BAX, BCL2). Para isto, foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix (A6002; Promega), de acordo com as instruções da empresa. Em suma, foram feitas reações de 10 µL contendo 2xGoTaq qPCR Master Mix, 0,5 µM de primer *forward* e *reverse* (apêndice B), amostra (cDNA) e água livre de RNAse e DNAse (variável). As amplificações foram realizadas no equipamento QuantStudio 6 Flex (Life Technology). As temperaturas e tempos utilizados foram 95 °C por 2 minutos para ativação da enzima DNA *Polymerase* e início da desnaturação das fitas de cDNA seguido de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação e 60 °C por 1 minuto para anelamento dos primers e extensão, quando ocorre a captação da fluorescência. Por fim, foram feitas análises da curva de *melting* para avaliar a presença de um único produto. As temperaturas para obtenção da curva foram 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos novamente. Os RNAm foram considerados presentes quando apresentaram CT menor que 37 e curvas de *melting* apropriadas, ou seja, representando apenas amplificação de um produto. Os dados de CT gerados pela amplificação foram normalizando utilizando a média geométrica de dois genes endógenos (*PPIA e RPL15*). A eficiência dos *primers* foi testada anteriormente, sendo utilizados aqueles com eficiência entre 90 e 110%, para avaliação da funcionalidade dos *primers* e melhor concentração das amostras a ser utilizadas nas reações.

4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram testados quanto à presença de *outliers*, normalidade e homocedasticidade. Foram utilizados testes de comparação entre médias, sendo que para os dados de comparação entre dois grupos experimentais, como a caracterização e conteúdo de miRNAs de VEs pequenas oriundas de folículos expostos à baixa ou alta concentração de P4, foi aplicado *Student's T-test*. Já para análises contendo mais de dois grupos experimentais, como na PIVE, quantificação de RNA e os níveis de RNAm foi aplicado ANOVA seguido de *Tukey's test*. Quando necessário, os dados foram transformados ou submetidos a teste não-paramétrico. As análises foram realizadas com auxílio do SAS e GraphPad Prism 7.0a considerando nível de significância de 5%. Os dados que foram submetidas a outro tipo de análise foram citados ao longo do texto.

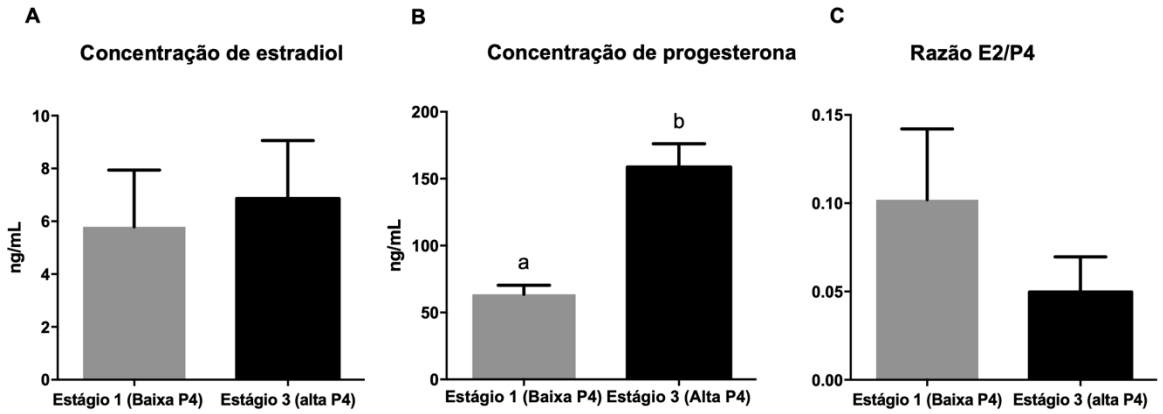
5 RESULTADOS

5.1 Estudo 1: Caracterização de vesículas extracelulares pequenas oriundas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral bovino.

5.1.1 Dosagem hormonal de fluido de folículos em diferentes estágios do ciclo estral

Os fluidos obtidos de folículos ovarianos em início (estágio 1) e meio de ciclo estral (estágio 3) foram selecionados de acordo com as características morfológicas do corpo lúteo, como descrito por Ireland, Murphee e Coulson (1980). A dosagem hormonal do FF foi utilizada para confirmar os estágios do ciclo estral e demonstrou semelhança na concentração de E2 (média do estágio 1: 5,79 ± 2,14 ng/mL; média do estágio 3: 6,86 ± 2,19 ng/mL; p=0,74; figura 12 A), mas diferença na concentração de P4 (média do estágio 1: 63,62 ± 6,79 ng/mL; média do estágio 3: 158,8 ± 17,47 ng/mL; p=0,002; figura 12 B). Além disso, os grupos de FF utilizados não apresentaram diferença na razão de E2/P4 (média do estágio 1: 0,10 ± 0,04; média do estágio 3: 0,04 ± 0,01; p=0,25; figura 12 C), um importante indicativo de atresia folicular (GRIMES; MATTON; IRELAND, 1987), sugerindo que os grupos de FF não apresentaram diferenças na proporção de atresia folicular. Portanto, conclui-se que o ambiente folicular em diferentes estágios do ciclo estral é exposto a diferentes níveis de P4, um importante modulador transcricional que pode afetar as células foliculares e o conteúdo de VEs secretado por essas células. A partir destes resultados, os diferentes grupos de FF foram denominados como baixa e alta P4, correspondente aos estágios 1 e 3 do ciclo estral, respectivamente.

Figura 12 - Dosagem de estradiol e progesterona em fluido folicular de diferentes estágios do ciclo estral bovino.



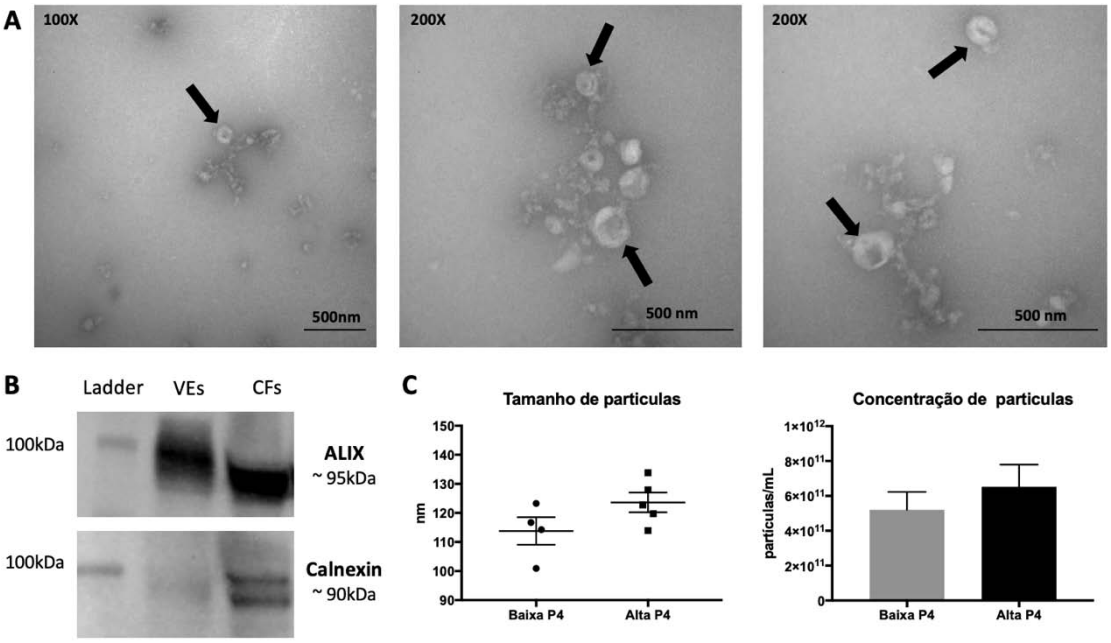
Os resultados demonstraram **(A)** a dosagem de E2 **(B)** a dosagem de P4 e **(C)** a razão entre E2 e P4 no fluido de folículos coletados de pares de ovários em estágio 1 (início de ciclo) e estágio 3 (meio de ciclo) do ciclo estral bovino. As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias. *Letras diferentes indicam p=0,002. Fonte: Própria autoria.

5.1.2 Caracterização de vesículas extracelulares pequenas de fluido folicular

Após determinação dos grupos de FF expostos à baixa e à alta concentração de P4, as VEs pequenas foram isoladas e caracterizadas. Inicialmente, o protocolo de isolamento de VEs pequenas foi validado a partir da análise de morfologia e tamanho de VEs obtidas no *pellet* por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão, assim como presença e ausência de proteínas específicas em VEs. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram partículas em formato de taça (*cup-shape*) e tamanho característico de VEs, como esperado segundo Lötvall et al. (2014) (Figura 13 A). Para verificar a presença de proteínas características de VEs utilizamos a técnica de *western blotting* para as proteínas ALIX e CALNEXINA (Figura 13 B). A proteína ALIX foi verificada no lisado de VEs e de células foliculares e a proteína marcadora de retículo endoplasmático, CALNEXINA, não foi encontrada no lisado de VEs, mas estava presente em células foliculares, como esperado segundo Lötvall et al. (2014). As partículas obtidas a partir do isolamento de fluido de folículos expostos à baixa e alta concentração de P4 foram mensuradas e contabilizadas por NTA. Os tamanhos das partículas estavam de acordo com o tamanho esperado de VEs pequenas, entretanto não houve diferença entre tamanho (**média VEs baixa P4**: 113,8 ± 4,70 nm; **média VEs alta P4**: 123,62 ±

3,40 nm) e concentração de partículas (**média VEs baixa P4**: 5,2 x 10^{11} ± 1,03 x 10^{11} partículas/mL; **média VEs alta P4**: 6,52 x 10^{11} ± 1,28 x 10^{11} partículas/mL) dos grupos de fluidos expostos à baixa e à alta concentração de P4 (Figura 13 C). Desta forma, estes resultados demonstram que o protocolo de isolamento de VEs é eficiente para obtenção de um precipitado enriquecido de VEs pequenas e que não há diferença das suas características de tamanho e concentração entre diferentes grupos de folículos expostos à baixa e à alta concentração de P4.

Figura 13 - Caracterização do *pellet* enriquecido de VEs pequenas a partir do isolamento de fluido folicular.



(A) O formato de taça característico de VEs (indicadas por setas pretas) bem como tamanho foram observados a partir de microscopia eletrônica de transmissão nos aumentos de 100 e 200 vezes. **(B)** As análises de *western blotting* demonstraram a presença de proteína específica de membrana ALIX (~90 kDa) no isolado de VEs e nas células foliculares (CF) e foi observada ausência da proteína CALNEXINA (~90 kDa; controle negativo) nas VEs e presença nas CF. Ambas estão próximas à marcação do *Ladder* (Lad) correspondente a 100kDa (**C**) O tamanho e a concentração de partículas isoladas de fluido de folículos expostos à baixa e alta P4 mensurados por NTA mostraram-se semelhantes às características de VEs. As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias. Fonte: Própria autoria.

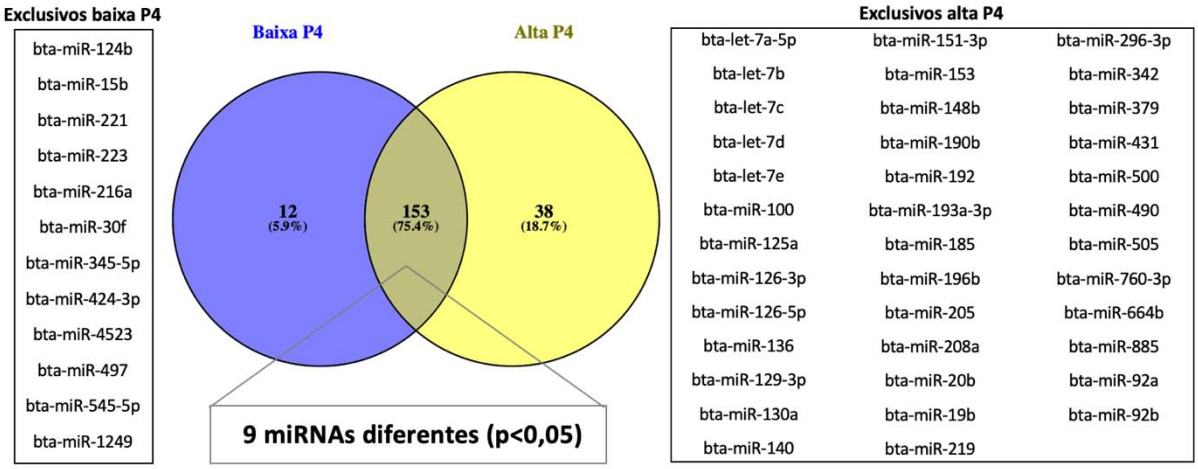
5.1.3 Perfil de miRNAs em vesículas extracelulares pequenas

Os perfis de miRNAs das VEs pequenas obtidas de fluido de folículos expostos às baixas e às altas concentrações de P4 foram avaliados utilizando um painel

customizado contendo as sequências de 383 miRNAs bovinos. Foi avaliado o conteúdo de miRNAs na forma madura somente e na forma precursora e madura concomitantemente. As amostras obtiveram alta repetibilidade dentro de cada grupo experimental, sendo o menor valor do coeficiente de determinação da reta (R^2) 0,77 para amostras referentes aos miRNAs maduros e 0,71 para amostras referentes aos miRNAs precursores e maduros. Os gráficos demonstrando a distribuição das amostras e a repetibilidade encontram-se no apêndice C.

Quanto à análise apenas de miRNAs maduros nas VEs pequenas, foram detectados 203 miRNAs totais nos dois grupos. Destes, 153 são comuns entre os dois grupos, 12 são exclusivos do grupo baixa P4 e 38 são exclusivos do grupo alta P4 (figura 14). Entre os miRNAs presentes em ambos os grupos, nove foram diferencialmente detectados entre baixa e alta P4, sendo três elevados no grupo baixa P4 (bta-miR-154a, bta-miR-339b e bta-miR-1287) e seis elevados no grupo alta P4 (bta-miR-144, bta-miR-195, bta-miR-222, bta-miR-301b, bta-miR-433, bta-miR-670; Apêndice D).

Figura 14 - Diagrama de *Venn* representando o número de miRNAs maduros presentes em VEs obtidas do fluido de folículos expostos à baixa e à alta concentração de progesterona.

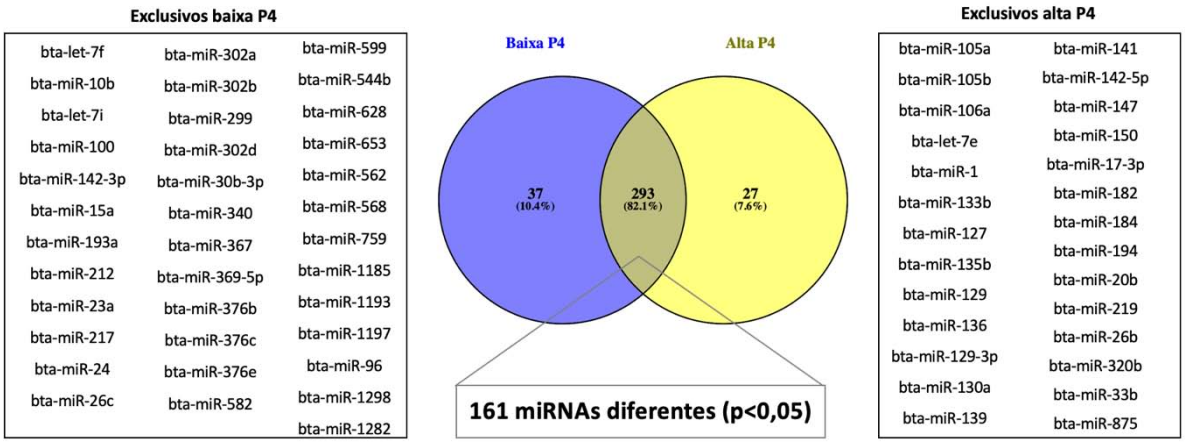


As análises demonstraram total de 203 miRNAs maduros detectados, sendo 153 miRNAs comuns aos dois estágios, enquanto 12 exclusivos do estágio 1 e 38 exclusivos do estágio 3. Os nove miRNAs considerados diferentes são comuns em ambos os grupos, mas apresentam diferente abundância ($p<0,05$). Fonte: Própria autoria.

Quanto as análises dos miRNAs precursores e maduros das mesmas amostras em que foram avaliados apenas os miRNAs maduros, foram detectados 357 miRNAs

no total. Destes, 37 exclusivos do grupo baixa P4 e 27 exclusivas do grupo alta P4 (figura 15). Entre os miRNAs presentes em ambos os grupos, 161 são diferentes entre os grupos, sendo todos eles elevados nas VEs do grupo baixa P4 (apêndice E).

Figura 15 - Diagrama de *Venn* representando o número de miRNAs precursores e maduros presentes em VEs obtidas do fluido de folículos expostos à baixa e alta concentração de progesterona.



As análises demonstraram total de 357 miRNAs nas formas precursores e maduros detectados, sendo 293 comuns entre os grupos, 37 exclusivos do grupo baixa P4 e 27 exclusivos do grupo alta P4. Os 161 miRNAs considerados diferentes são comuns em ambos os grupos, mas apresentam diferente abundância entre eles ($p<0,05$). Fonte: Própria autoria.

Portanto, a partir deste estudo concluímos que o conteúdo de miRNAs maduros e precursores em VEs pequenas é modificado de acordo com diferentes estágios do ciclo estral bovino, os quais foram indicados por diferentes concentrações de P4 intrafolicular. Estas modificações no perfil de miRNAs carregado por VEs pequenas podem influenciar vias biológicas reguladas por miRNAs e seus alvos no ambiente folicular.

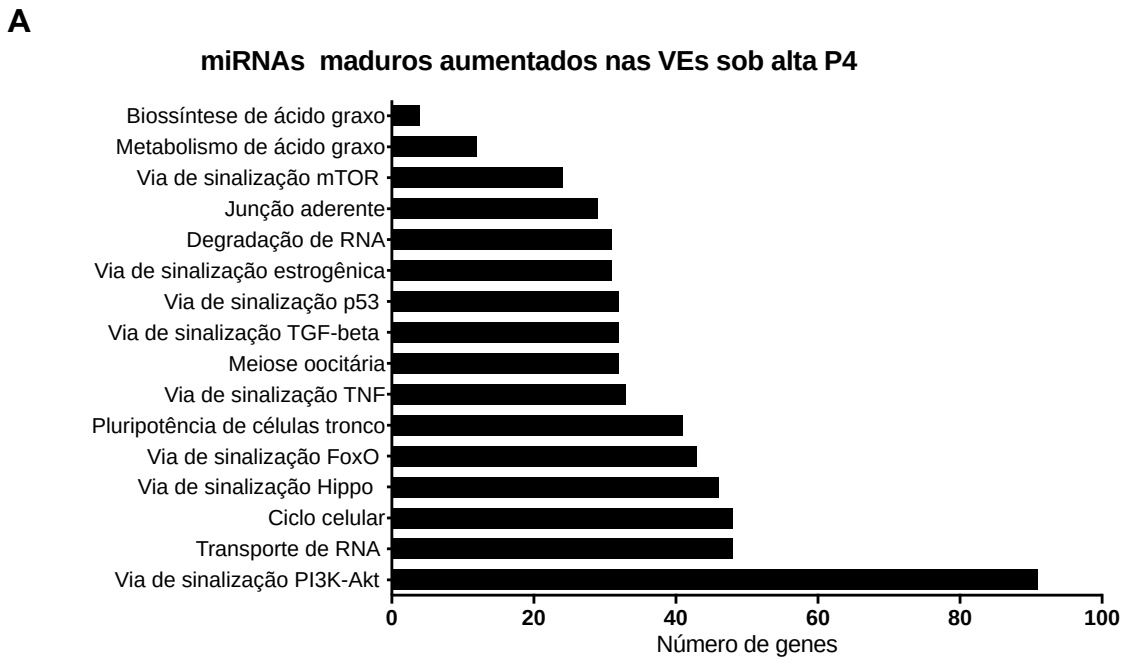
5.1.4 Vias biológicas reguladas por miRNAs presentes em vesículas extracelulares pequenas de fluido folicular em diferentes estágios do ciclo estral bovino

Para estudar as funções dos miRNAs presentes nas VEs pequenas dos diferentes grupos de FF bovino foram realizadas análises de bioinformática utilizando o *software mirPath* v.3 na plataforma DIANA TOOLS. Esta base de dados não possui

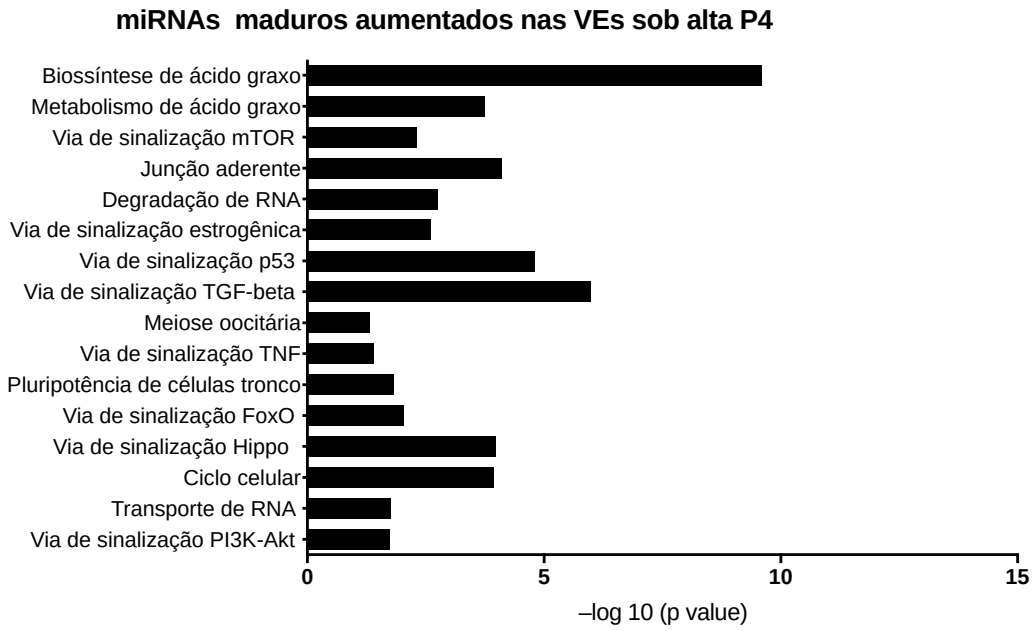
informações para sequência bovinas, por isso as sequências dos miRNAs bovinos foram comparadas às sequências humanas (apêndices D e E) e apenas os miRNAs acima de 90% de similaridade foram utilizados para análise de bioinformática.

Dentre os miRNAs maduros diferentes entre os grupos, aqueles elevados nas VEs pequenas sob baixa P4 (bta-miR-154a, bta-miR-339b e bta-miR-1287) não apresentaram regulação de vias relacionadas ao ambiente folicular ou a demais eventos reprodutivos. Já os seis miRNAs maduros elevados no grupo de VEs pequenas sob alta P4 (bta-miR-144, bta-miR-195, bta-miR-222, bta-miR-301b, bta-miR-433 e bta-miR-670) apresentaram 16 vias de interesse a partir das análises de bioinformática (figura 16), muitas delas relacionadas ao controle da proliferação celular e desenvolvimento oocitário, como as vias de sinalização PI3K-Akt, transporte de RNA, ciclo celular, via de sinalização Hippo, FoxO e mTOR.

Figura 16 - Representação das vias reguladas por miRNAs maduros elevados em VEs pequenas do fluido de folículos sob alta P4 em comparação aos folículos sob baixa P4.



B

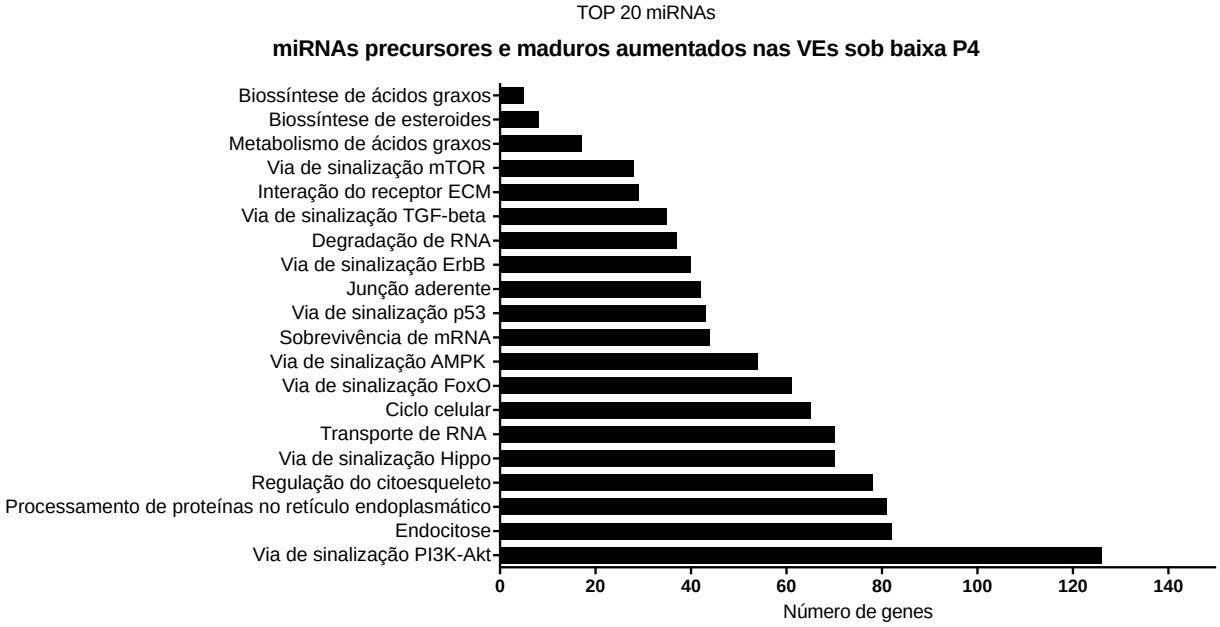


Representação de vias de sinalização que podem ser moduladas por miRNAs maduros aumentados em VEs pequenas sob alta P4 em comparação à baixa P4. **(A)** Representação do número de genes alvos dos miRNAs maduros em cada via de sinalização. **(B)** Representação da significância de modulação da via de acordo com o valor de p. Os valores de p foram normalizados utilizando -log 10. Fonte: Própria autoria.

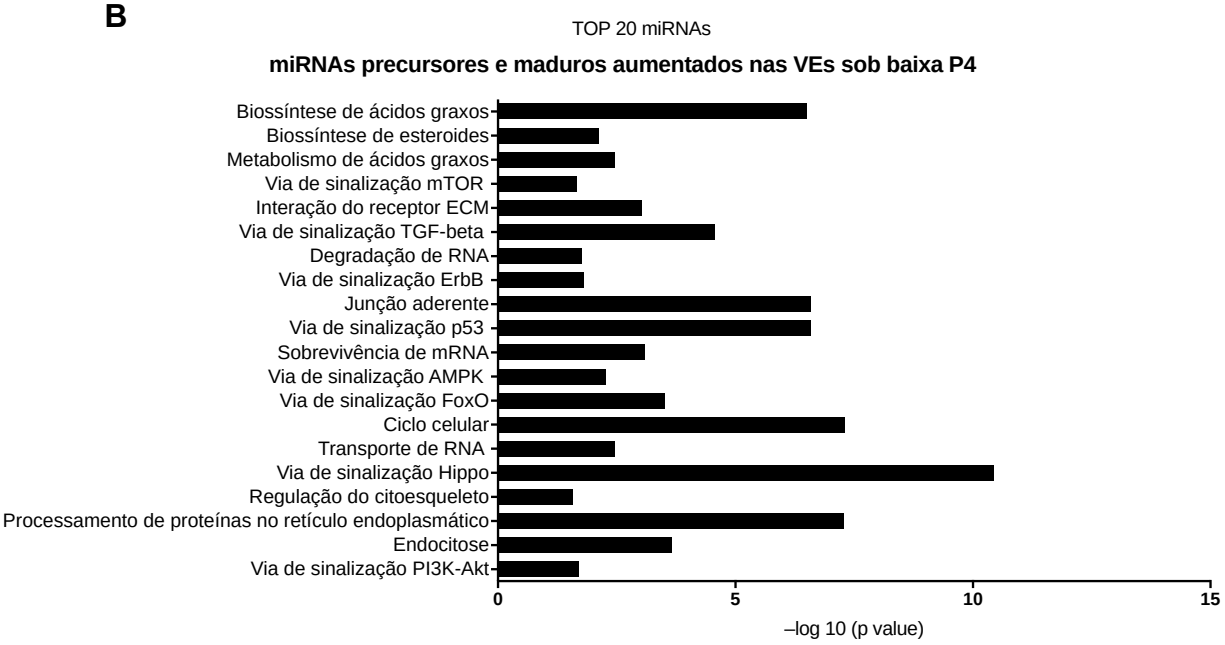
Os miRNAs nas formas precursoras e maduras analisados concomitantemente que apresentaram diferença entre os grupos de FF foram todos elevados no grupo baixa P4 em comparação ao grupo alta P4. As vias reguladas por estes miRNAs foram avaliadas utilizando os top 20 e top 100 miRNAs, ordenados a partir dos menores valores de p (figura 17). Grande parte das vias encontradas estão relacionadas à proliferação celular e desenvolvimento oocitário e estão presentes nas análises realizadas com os diferentes números de miRNAs. As vias de interesse com os maiores números de transcritos regulados são a via de sinalização MAPK, processo de endocitose, processamento de proteína no retículo endoplasmático, via de sinalização PI3K-Akt, via de transporte de RNA, via de sinalização Hippo e FoxO.

Figura 17 - Representação de 20 vias reguladas por miRNAs precursores e maduros presentes elevados em VEs do fluido folicular do grupo baixa P4 em comparação ao grupo alta P4.

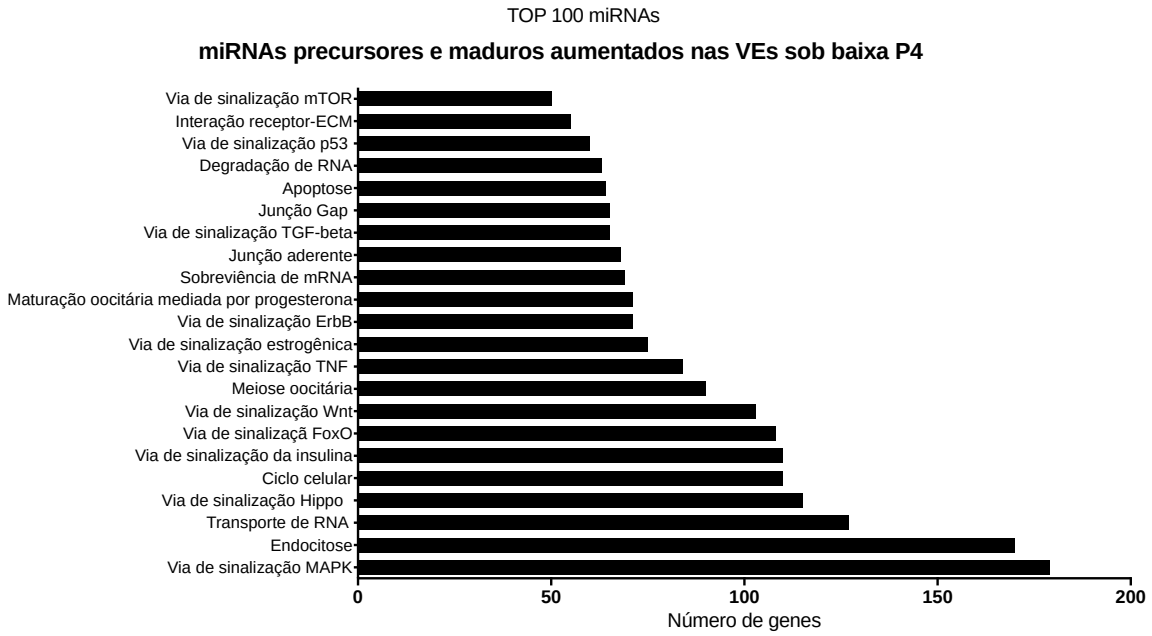
A



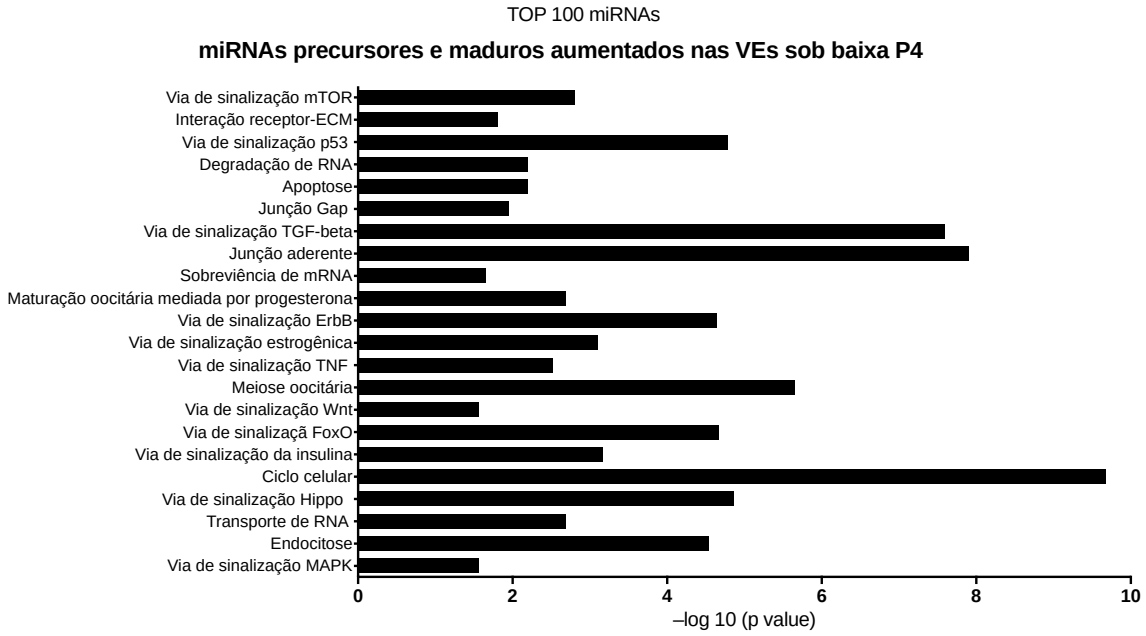
B



C



D



As figuras representam as vias reguladas pelos **(A e B)** top 20 e **(C e D)** e top 100 miRNAs elevados no dos grupos de VEs sob baixa P4 em comparação as VEs sob alta P4, considerando os menores valores de p dos miRNAs. Nas figuras **A** e **C** foram considerados os números de potenciais genes (eixo X) que podem estar sendo regulados pelos miRNAs. Já as figuras **B** e **D** o eixo X representa o valor de p transformado por *-log 10* de cada via biológica. Fonte: Própria autoria.

Em conclusão, as análises utilizando bioinformática indicaram possíveis vias que podem estar sendo reguladas por miRNAs carregados por VEs pequenas do FF.

Um importante número de vias relacionadas a processos biológicos que impactam o ambiente folicular e a maturação oocitária foram elencadas de acordo com o número de genes e os valores de p. Desta forma, a partir destes resultados será possível investigar vias de sinalizações específicas que podem ser moduladas de formas distintas dependendo da origem das VEs pequenas, ou seja, em momentos distintos do ciclo estral em que haja folículos expostos a baixas ou altas concentrações de P4.

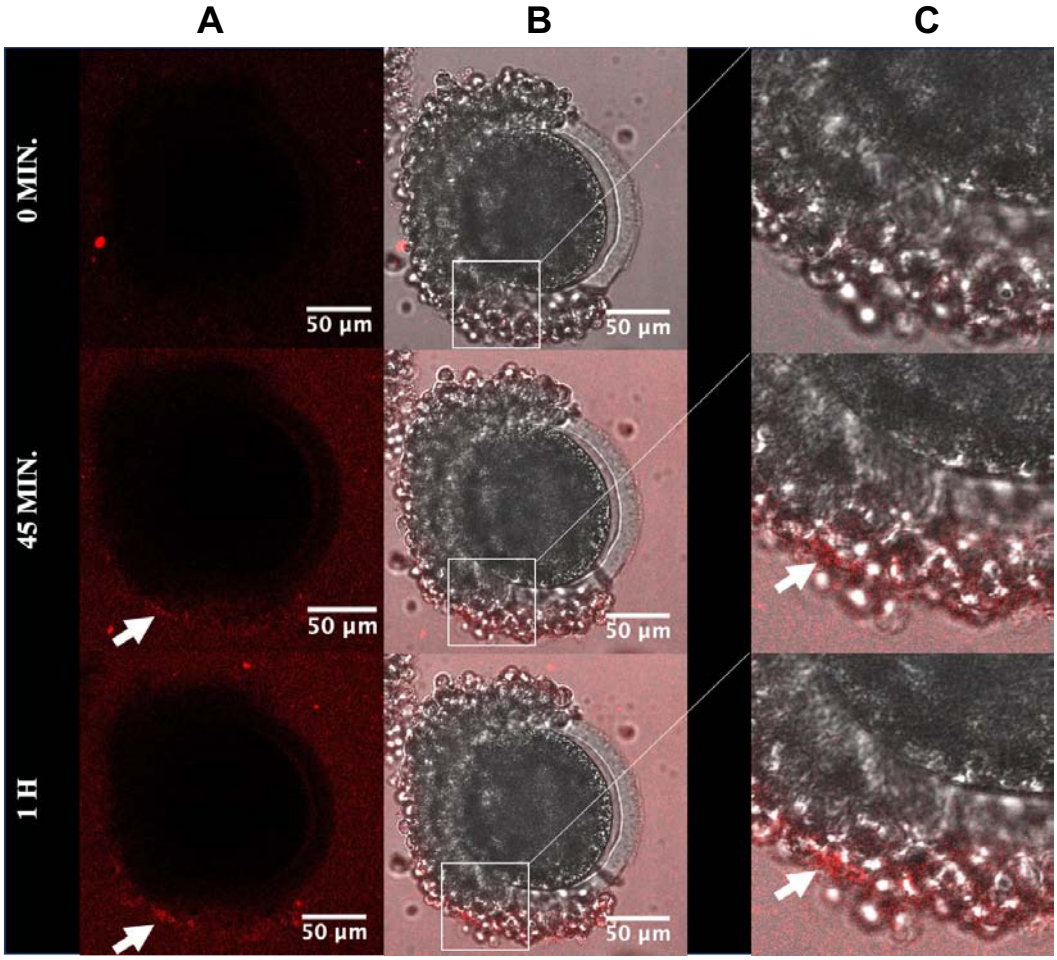
5.2 Estudo 2: O uso de vesículas extracelulares pequenas como suplementação na maturação in vitro de complexos cumulus-oócitos bovinos.

5.2.1 Avaliação da internalização de vesículas extracelulares pequenas por complexos cumulus-oócitos durante a maturação in *vitro*

Para estudo da dinâmica de comunicação entre VEs pequenas do FF e CCOs durante a maturação *in vitro,* foi utilizada a técnica de *live cell imaging* em microscopia confocal. A partir desta técnica foi possível avaliar a internalização de VEs pequenas marcadas com corante de membrana por CCOs vivos imediatamente após a punção destes CCOs do folículo ovariano seguida do início da maturação *in vitro* em placas de cultivo. Este experimento foi desenvolvido no Departamento de Ciência Animal, na Universidade Laval, em colaboração com o Prof. Dr. Claude Robert.

Inicialmente, foi realizado vídeo para estimar o início da internalização de VEs pequenas por células do cumulus desde o momento em que o CCO foi colocado em placa de cultivo. A partir do vídeo realizado foi possível estimar que as células do cumulus iniciam a internalização das VEs pequenas a partir de 45 minutos, considerando o momento em que foi possível visualizar as primeiras marcações de VEs pequenas (vermelho) localizadas nas primeiras camadas de células do cumulus (figura 18).

Figura 18 – Imagens ao vivo (*live cell imaging)* da internalização de VEs pequenas durante a primeira hora de maturação *in vitro*.



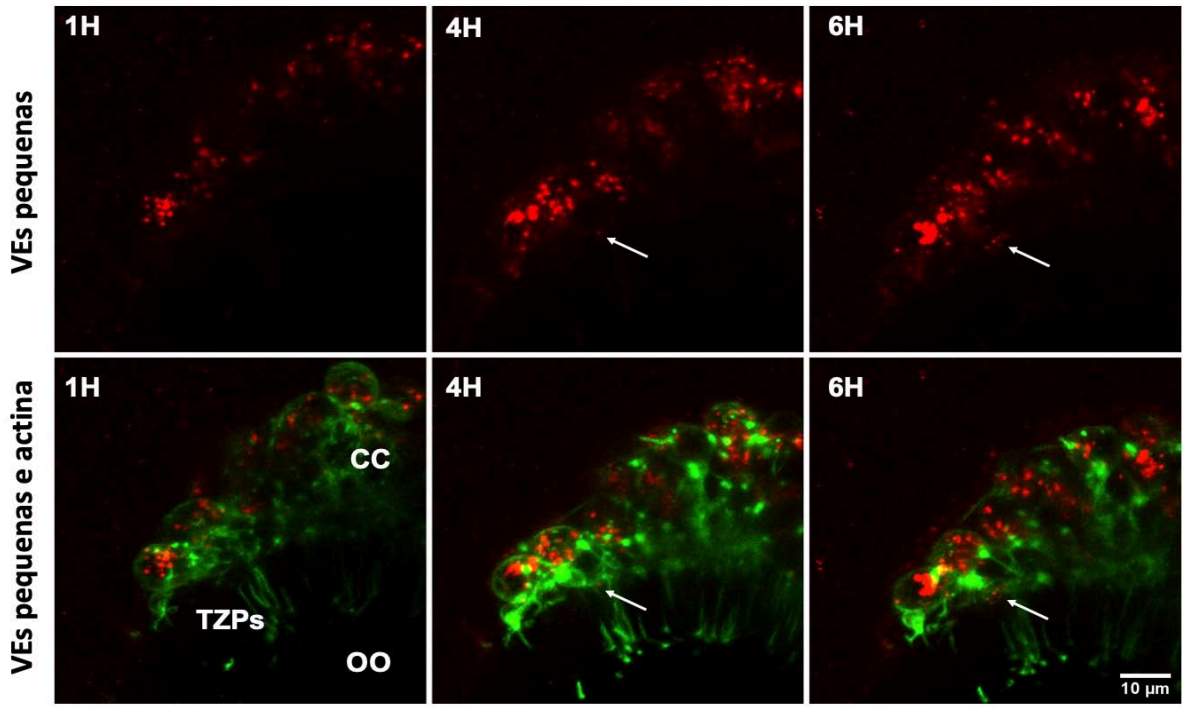
As imagens representam momentos dos vídeos realizados nos tempos zero, 45 minutos e 1 hora de maturação *in vitro* do CCO. As imagens demonstram o início da internalização de VEs pequenas (marcadas em vermelho). A partir das imagens foi possível observar que aos 45 minutos de vídeo os primeiros pontos vermelhos são encontrados nas células do cumulus (seta branca). As imagens foram obtidas até 60 minutos (1 hora) de maturação em objetiva de 20x. A= CCOs em campo escuro, B= CCOs em campo claro, C=As imagens da coluna B foram submetidas a aumento digital. Fonte: Própria autoria.

Em seguida, demais vídeos foram realizados ao longo da maturação *in vitro*. A partir destes vídeos foi possível demonstrar que as VEs pequenas marcadas são dinâmicas nas células do cumulus, ou seja, movimentam-se entre as células desde as primeiras camadas até a proximidade com a zona pelúcida (figura 19). Adicionalmente, os vídeos demonstram que as VEs pequenas marcadas movimentam-se até atingir a região inicial das TZPs (figura 20). De forma semelhante, foi possível observar marcações de VEs pequenas localizadas no início das TZPs, bem como na região perinuclear das células do cumulus, em CCOs fixados após 4 e 9 horas de maturação *in vitro* (figura 21). Ainda, foi possível localizar marcações de

VEs pequenas próximas ao ooplasma (figura 22 A) e em projeções entre células (figura 22 B). Ao final da maturação *in vitro* (entre 18 e 22 horas de MIV), os CCOs estavam completamente marcados com VEs pequenas, principalmente em células do cumulus (figura 23 A). Em todos os experimentos foram realizados controles negativos, ou seja, adição do diluidor de VEs pequenas que passou pelo mesmo protocolo de coloração de VEs pequenas. As imagens dos controles demonstraram que não houve marcação de CCOs como observado na presença de VEs pequenas marcadas (figura 23 B).

Portanto, a partir destes resultados foi possível confirmar a internalização de VEs pequenas principalmente por células do cumulus desde o início da maturação *in vitro*. Ademais, foi possível observar que um menor número de VEs pequenas pode atingir a região do início da TZP, importante local de passagem de moléculas entre células do cumulus e oócitos, assim como o citoplasma oocitário.

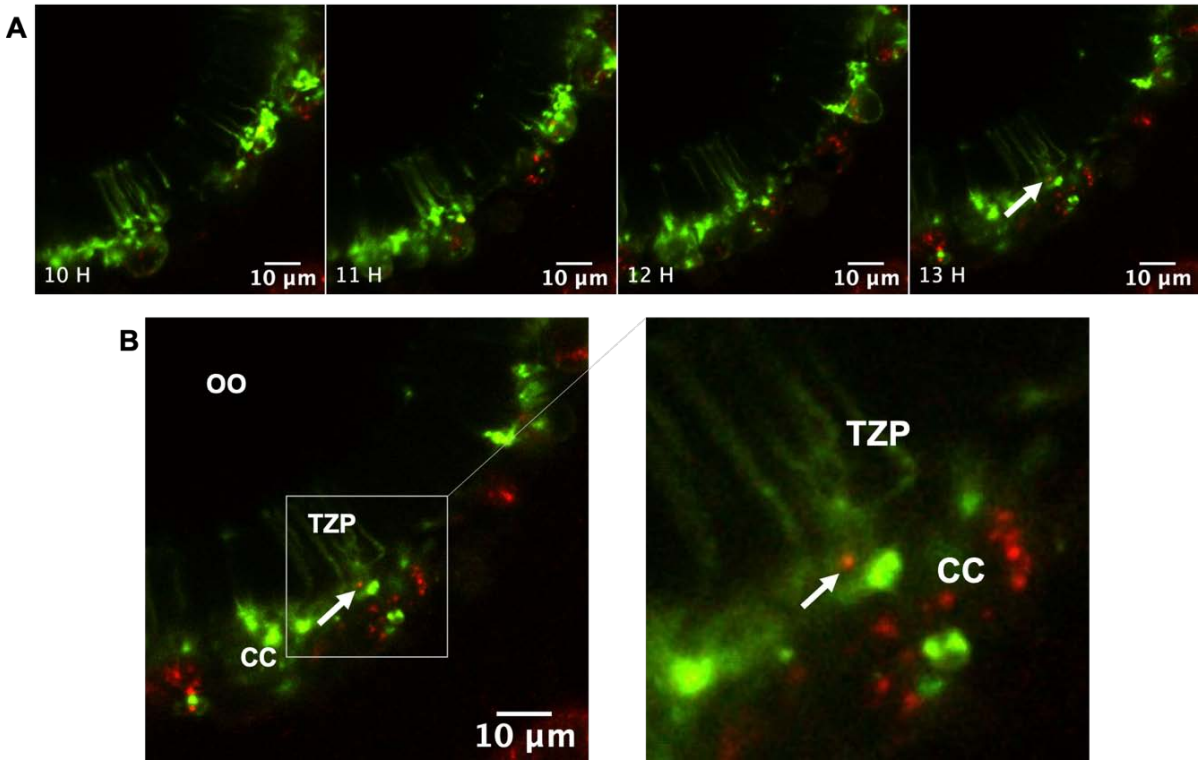
Figura 19 – Imagens representativas de vídeo em tempo real demonstrando a interação entre VEs pequenas e CCOs durante a maturação *in vitro*.



Imagens representando vídeos durante a maturação *in vitro*. As VEs pequenas (corante PKH26; vermelho) são internalizadas por células do cumulus desde o início da maturação, representada por 1 hora de maturação. Ao longo da maturação é possível verificar presença das VEs pequenas próximas a região da zona pelúcida (setas brancas). A primeira linha representa imagens apenas com marcação de VEs pequenas (vermelho) e a segunda linha representa a marcação da actina dos CCOs (corante Sir-Actin; verde). As imagens foram obtidas nos tempos 1, 4 e 6 horas de maturação *in vitro* em objetiva de 40x e 2.0 de zoom

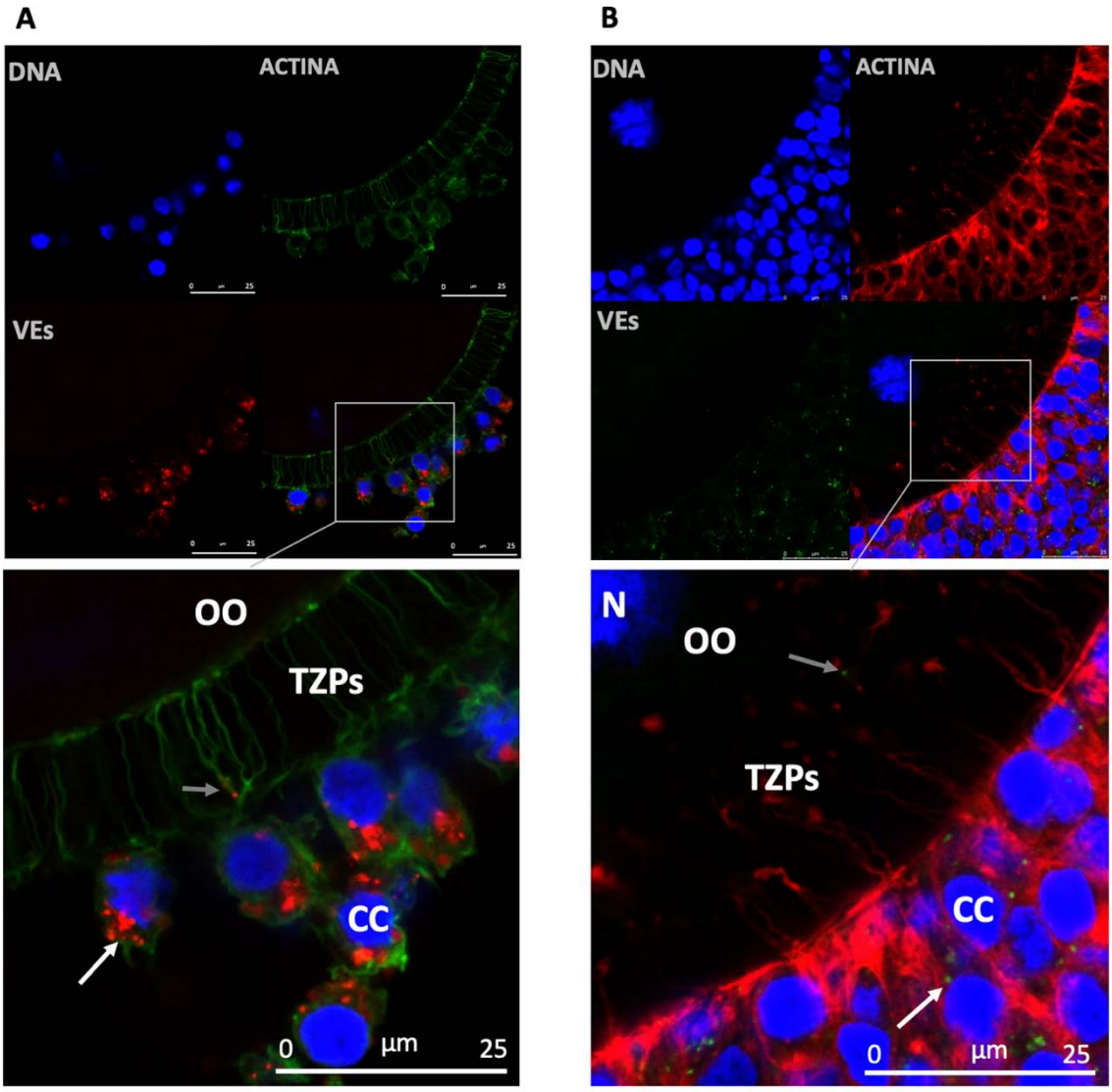
digital em óleo. CC= células do cumulus; TZP= projeções transzonais e OO= citoplasma do oócito. Fonte: Própria autoria.

Figura 20 – Imagens representativas de vídeo em tempo real demonstrando a proximidade de VEs pequenas ao início da TZP.



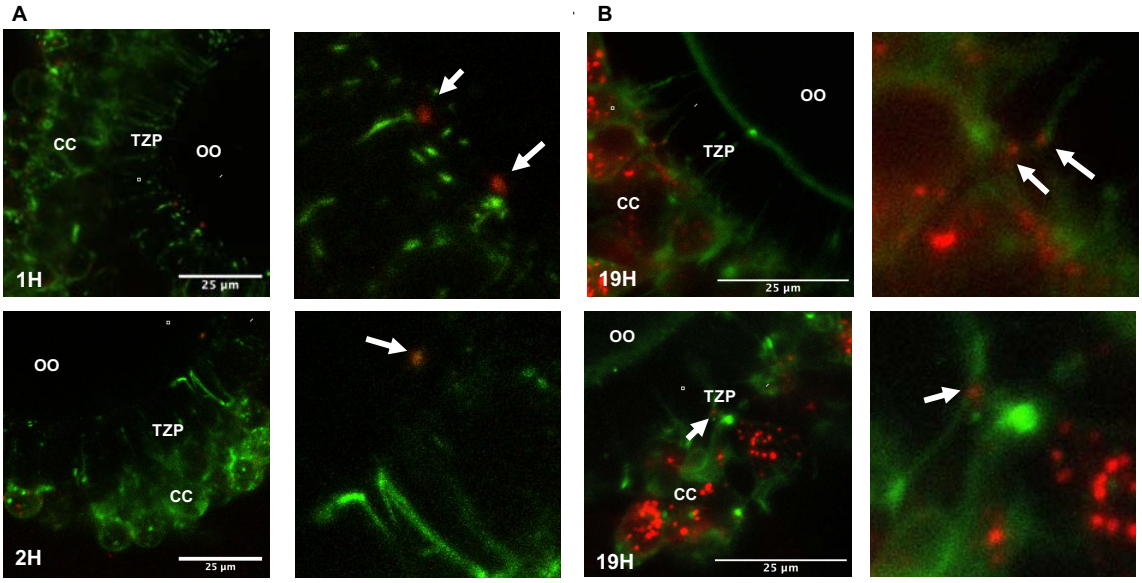
(A) Sequência de imagens demonstrando a internalização de VEs pequenas (vermelho) pelas células do cumulus entre 10 e 13 horas de maturação *in vitro*. **(B)** Presença de VE pequena (vermelho) localizada no início da TZP (seta branca). Os CCOs foram corados com Sir-actin (actina; verde). As imagens foram obtidas em objetiva 40x e zoom digital de 2.0, em óleo. A imagem B ampliada foi submetida a zoom digital. CC= células do cumulus; TZP= projeções transzonais e OO= citoplasma do oócito. Fonte: Própria autoria.

Figura 21 – Imagens de CCOs fixados após 4 e 9 horas de maturação *in vitro* demonstrando a localização de VEs pequenas próximas às TZPs.



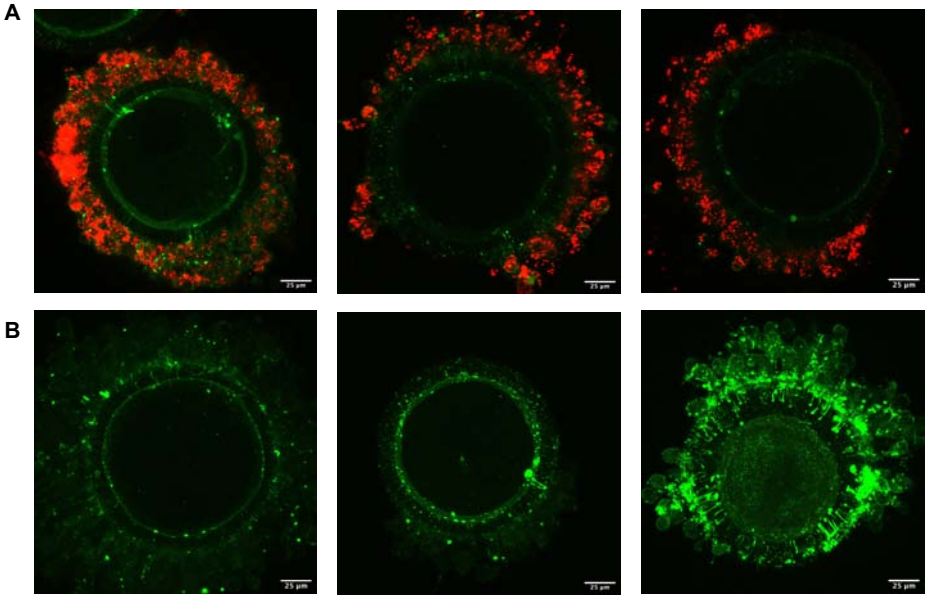
(A) Imagens após 4 horas de maturação *in vitro* demonstrando a presença de VEs pequenas (corante PKH26; vermelho) na região perinuclear das células do cumulus (seta branca) e co-localização com a TZP (verde; seta cinza). **(B)** Imagem após 9 horas de maturação *in vitro* demonstrando a presença de VEs pequenas (corante PKH67; verde) na região perinuclear (seta branca) e próximas à TZP (vermelha; seta cinza). As imagens foram obtidas em objetiva de 63x em óleo. As imagens indicadas pela caixa foram ampliadas digitalmente. OO= oócito; TZP= projeções transzonais; CC= células do cumulus e N= núcleo. Fonte: Própria autoria.

Figura 22- Imagens representativas de vídeo ao vivo demonstrando a presença de VEs pequenas localizadas no ooplasma e em projeções entre células.



(A) Marcações correspondentes a VEs pequenas (vermelho) localizadas na região do citoplasma oocitário (seta branca) em 1 e 2 horas de maturação *in vitro*. **(B)** Marcações correspondentes a VEs pequenas (vermelho) co-localizadas com TZPs em 19 horas de maturação *in vitro*. As imagens foram obtidas em objetiva de 40x e zoom digital de 2.0, em óleo. As imagens da caixa branca passaram por aumento digital. OO=oócito; TZP= projeções tranzonais; CC= células do cumulus. Fonte: Própria autoria.

Figura 23 – Complexos cumulus-oócitos fixados após 18 a 22 horas de maturação *in vitro*.



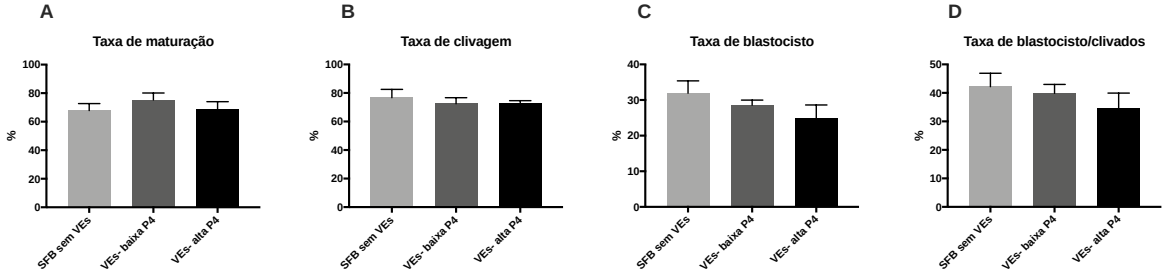
(A) Complexos cumulus-oócitos ao final da maturação *in vitro* suplementados com VEs pequenas marcadas com corante de membrana (PKH26, vermelho). **(B)** Complexos cumulus-oócitos ao final da maturação *in vitro* suplementados apenas com o diluente de VEs pequenas (1x PBS livre de cálcio e magnésio) após coloração com corante de membrana (PKH26,

vermelho). Todos os CCOs foram corados com Sir-Actina (actina, verde). As imagens foram obtidas em objetiva 40x em óleo e submetidas a MIP (*maximum intensity projections*) de 36 secções (1µm de espessura cada) a partir do centro do CCO. Fonte: Própria autoria.

5.2.2 Efeito de vesículas extracelulares pequenas oriundas de fluido de folículos sob baixa e alta P4 nas taxas de maturação de CCOs e de produção in *vitro* de embriões bovinos

Para analisar os efeitos da adição de VEs pequenas na maturação *in vitro* e produção *in vitro* de embriões, CCOs bovinos (n=770) foram tratados durante a maturação *in vitro* com VEs pequenas de fluido de folículos expostos à baixa ou à alta concentração de P4. Os CCOs foram submetidos a meios de maturação suplementados com: **1)** SFB depletado de VEs (SFB sem VEs); **2)** SFB depletado de VEs e adição de VEs do grupo baixa P4 (VEs- baixa P4); **3)** SFB depletado de VEs e adição de VEs do grupo alta P4 (VEs – alta P4). O total de 351 CCOs foram desnudados após 20 horas de maturação *in vitro* para avaliação da extrusão do 1°corpúsculo polar (taxa de maturação). Não houve diferença entre os tratamentos quanto à taxa de maturação (figura 24; tabela 1). O total de 419 CCOs foram fertilizados e cultivados *in vitro* para avaliação das taxas de clivagem e blastocistos. A partir deste experimento não foi possível observar diferenças nas taxas de clivagem e blastocistos entre os grupos (figura 24; tabela 1). Portanto, a suplementação com VEs pequenas do fluido de folículos sob baixa e alta concentração de P4 apenas na maturação *in vitro* não influenciou as taxas de produção *in vitro* neste modelo experimental.

Figura 24- Representação gráfica das taxas de maturação e de produção *in vitro* de embriões após tratamento de VEs pequenas de fluido de folículos sob baixa e alta P4 no meio de maturação.



(A) Taxa de maturação de oócitos a partir da contagem de extrusão do primeiro corpúsculo polar. **(B)** taxa de clivagem no dia 3 de cultivo *in vitro*. **(C)** taxa de blastocistos no dia 7 de

cultivo. **(D)** taxa de blastocistos no dia 7 de cultivo em relação ao número de estruturas clivadas no dia 3 de cultivo *in vitro*. As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias. Fonte: Própria autoria.

Tabela 1 – Representação das médias de taxa de maturação, taxa de clivagem e taxa de produção de blastocistos após tratamento de CCOs com VEs do fluido de folículos expostos à baixa e à alta concentração de P4 em meios de maturação.

Tratamento	*N[1]*	*Maturação (%)*	*N[2]*	*Clivagem (%)*	*Blastocistos (%)*	*Blast./clivados(%)*
SFB sem VEs	128	67,78 ± 4,94	147	76,72 ± 5,79	31,92 ± 3,47	42,20 ± 4,70
VEs – baixa P4	105	75,21 ± 4,88	123	72,41 ± 4,29	28,54 ± 1,44	39,86 ± 3,11
VEs – alta P4	118	68,56 ± 5,52	149	72,52 ± 2,07	24,89 ± 3,73	34,63 ± 5,30
Total	**351**		**419**			

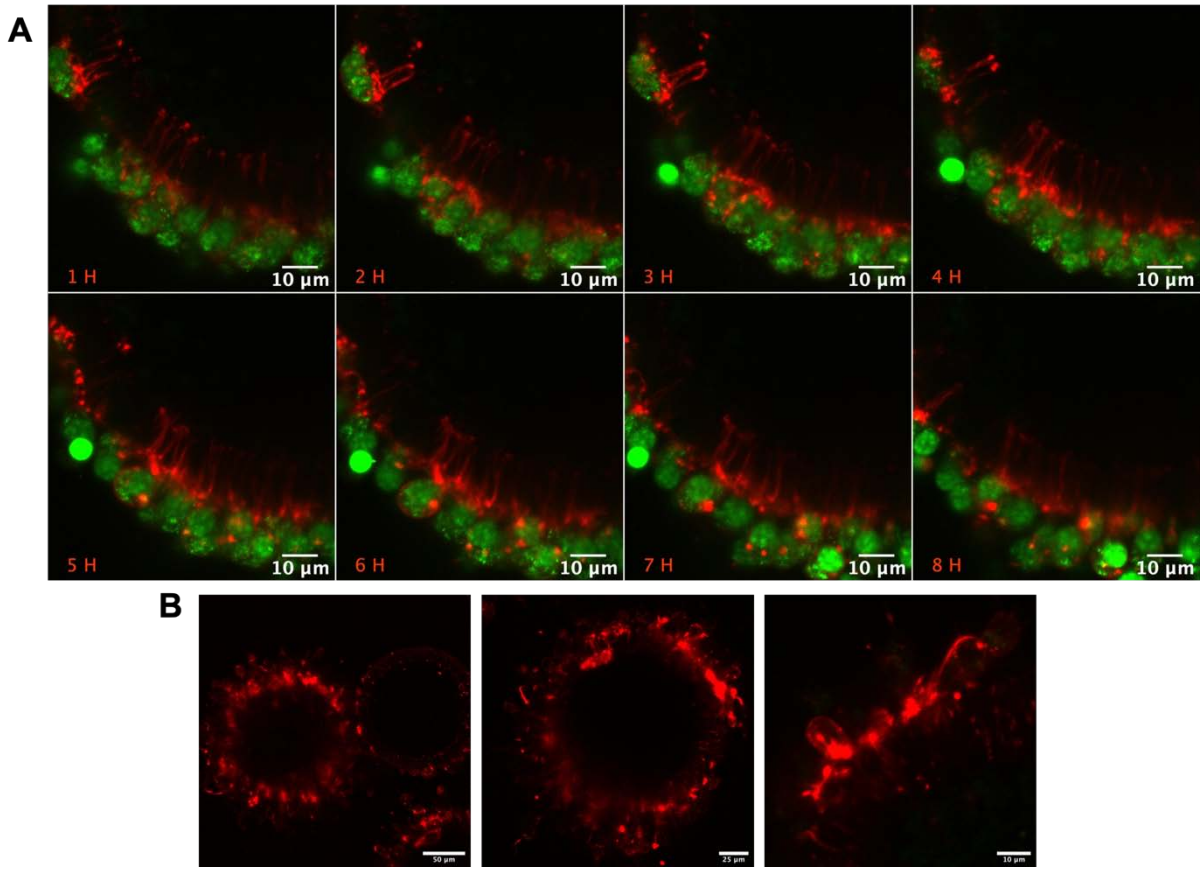
N^1= número de oócitos totais em que foi avaliada extrusão do primeiro corpúsculo polar; N^2 = número total de possíveis zigotos mantidos no cultivo *in vitro.* Os valores representam as médias de produção e o erro padrão das médias. Fonte: Própria autoria.

5.3 Estudo 3: O impacto da suplementação de vesículas extracelulares pequenas no transporte de RNA em complexos cumulus-oócitos bovinos durante a maturação in vitro.

5.3.1 Internalização do RNA de vesículas extracelulares pequenas em células do cumulus após suplementação de complexos cumulus-oócitos

A partir dos resultados da interação entre VEs pequenas coradas e CCOs durante a maturação e pelo fato dos miRNAs presentes nas VEs pequenas serem possíveis reguladores da via de transporte de RNA, foram realizados experimentos para avaliar o impacto da suplementação de VEs pequenas no transporte de RNA. Inicialmente, o RNA total de VEs pequenas foi corado e estas vesículas foram adicionadas ao meio de maturação. A maturação *in vitro* foi acompanhada por imagens em tempo real em microscópio confocal. Estas imagens demonstraram que, de forma semelhante ao que foi visto quando a membrana das VEs pequenas foi marcada, há entrada do RNA marcado de VEs pequenas nas células do cumulus (figura 25 A). Os CCOs tratados apenas com o diluente das VEs pequenas corado não apresentaram coloração dos RNAs (figura 25 B).

Figura 25 – Representação de imagens em tempo real durante a maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócitos suplementados com VEs pequenas cujo RNA foi corado.



(A) Imagem de CCO maturado na presença de VEs pequenas cujo RNA foi corado (verde). É possível determinar que as marcações verdes se encontram nas células do cumulus. As imagens representam os momentos de 1 a 8 horas de maturação *in vitro*. **(B)** Complexos cumulus-oócitos suplementados apenas com diluente de VEs pequenas, o qual passou pelo mesmo procedimento de coloração de RNA (controle). As imagens foram obtidas em objetiva de 40x em óleo e as imagens da figura A foram submetidas a 2.0 de zoom. Todos os CCOs foram corados com corante específico para actina no meio de maturação (vermelho). Fonte: Própria autoria.

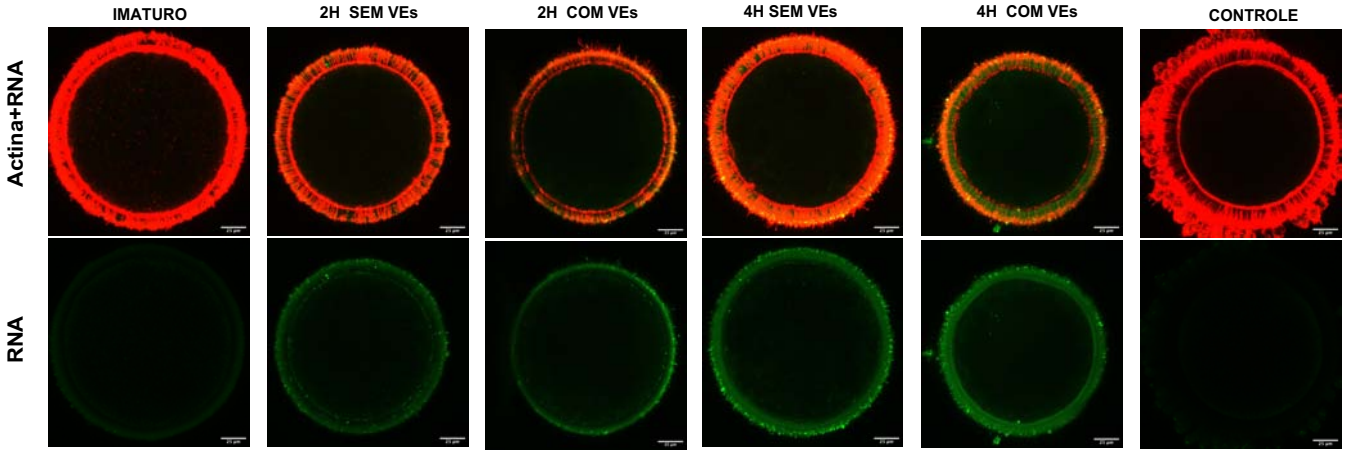
5.3.2 Quantificação de moléculas de RNA na zona pelúcida de oócitos após suplementação com vesículas extracelulares pequenas

Este estudo foi realizado para quantificar moléculas de RNA localizadas na região da zona pelúcida dos oócitos, visto que as células do cumulus são importante fonte de RNA para o oócito e que as VEs pequenas são veículos de moléculas para as células do cumulus. Portanto, o efeito da adição de VEs pequenas foi avaliado em períodos de início da maturação *in vitro* (após 2 e 4 horas do início da MIV), os quais foram comparados com oócitos imaturos (n=total de 260 CCOs). As imagens

demonstraram a presença de moléculas de RNA na região da zona pelúcida em todos os grupos experimentais, principalmente no CCOs que passaram pela maturação *in vitro,* exceto no grupo controle, em que não houve adição do corante de RNA (figura 26). As marcações de RNA na região da zona pelúcida foram quantificadas utilizando ferramentas do ImageJ. Os resultados mostraram aumento do transporte de RNA do grupo maturado sem VEs pequenas no momento 4 horas em comparação aos CCOs imaturos. De forma semelhante, os CCOs maturados com VEs apresentaram aumento de RNA desde o momento 2 horas de maturação quando comparados aos CCOs imaturos (figura 27; tabela 2). Entretanto, não houve diferença entre os grupos maturados com ou sem VEs pequenas.

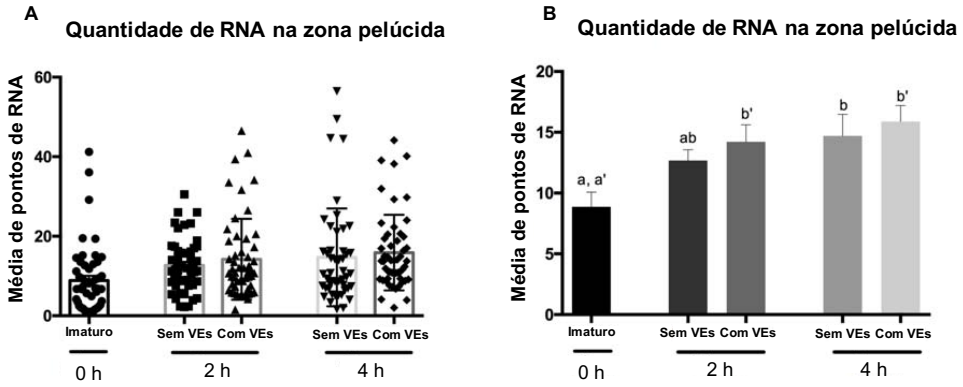
Enfim, a partir deste experimento foi possível verificar que as moléculas de RNA são encontradas na região da zona pelúcida, indicando importância das células do cumulus para o envio de moléculas ao citoplasma oocitário. Ainda, o tempo de maturação *in vitro* influenciou na média de moléculas de RNA encontradas na região da zona pelúcida. Porém, a partir desta análise não foi possível verificar aumento da média de RNA localizado na zona pelúcida quando os CCOs foram tratados com VEs pequenas.

Figura 26 - Imagens representativas de oócitos desnudos utilizados para quantificação de moléculas de RNA na região da zona pelúcida.



As imagens representam oócitos imaturos ou maturados *in vitro* na presença ou ausência de VEs pequenas do FF e controle (ausência de coloração do RNA). A actina foi corada (vermelho) para ser utilizada como referência da região da zona pelúcida. O RNA total dos CCOs foi corado (verde) e as células do cumulus foram retiradas em seguida para realizar imagens da zona pelúcida. As imagens foram obtidas em objetiva de 40x em óleo e submetidas ao processamento MIP (maximum intensity projections; ferramenta para união do *z-stack*) para junção das 21 secções. Fonte: Própria autoria.

Figura 27 – Representação gráfica demonstrando a média dos pontos de RNA quantificados na região da zona pelúcida de oócitos imaturos ou maturados durante 2 e 4 horas na ausência ou presença de VEs pequenas.



(A) Os pontos no gráfico representam a média de moléculas de RNA quantificadas em 21 secções de cada oócitos analisado. (B) O gráfico de barras demonstra a média dos pontos de RNA e a barra de erro representa o erro padrão da média. As letras **a** e **b** referem-se à comparação entre o grupo imaturo e o grupo sem VEs. Já as letras **a'** e **b'** referem-se à comparação entre imaturo e o grupo com VEs. As letras diferentes indicam valor de p <0,05. Fonte: Própria autoria.

Tabela 2 – Detalhamento do número de oócitos analisados por grupos experimental e a média e desvio padrão do RNA quantificado em cada grupo.

Grupo experimental*	Número de oócitos analisados	Média de pontos de RNA ± DP
0 h- Imaturo	53	8.86 ± 8.52 [a, a']
2 h- sem VEs	53	12.68 ± 6.46 [ab]
2 h- com VEs	53	14.22 ± 10.17 [b']
4 h- sem VEs	48	14.70 ± 12.30 [b]
4 h- com VEs	53	15.88 ± 9.50 [b']

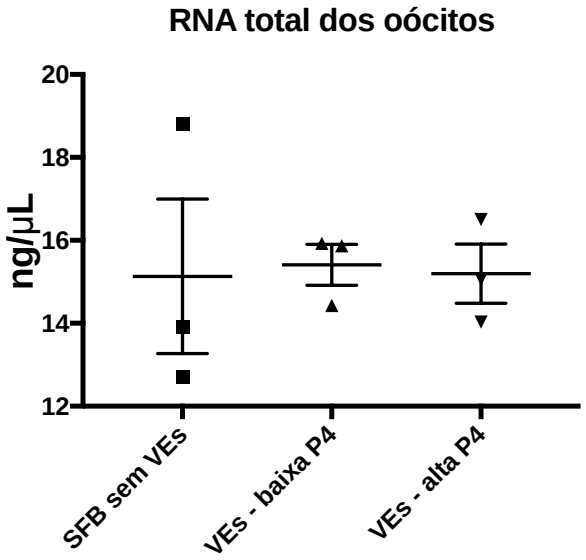
* Variável de acordo com o momento da maturação e tratamento com VEs. As letras **a** e **b** referem-se à comparação entre o grupo imaturo e o grupo sem VEs. Já as letras **a'** e **b'** referem-se à comparação entre imaturo e o grupo com VEs. As letras diferentes indicam valor de p <0,05. DP = Desvio padrão. Fonte: Própria autoria.

5.3.3 Quantificação do RNA total em oócitos desnudos após suplementação com vesículas extracelulares pequenas

Para finalizar o estudo 3, foi realizada a quantificação do RNA total em oócitos desnudos. Para isso, os CCOs bovinos foram maturados *in vitro* com meio suplementado apenas com SFB depletado de VEs (SFB sem VEs) ou com VEs pequenas oriundas de fluido de folículos expostos a baixas ou altas concentrações de

P4. Apenas os oócitos que completaram a maturação nuclear, ou seja, que tiveram extrusão do primeiro corpúsculo polar, foram utilizados para esta quantificação (n=grupos de 10 oócitos/ tratamento). Os resultados indicaram que as médias de RNA total são semelhantes entre os grupos de oócitos (figura 28). Em conclusão, a partir deste estudo, a suplementação com VEs pequenas durante a maturação não influenciou a quantidade de RNA acumulado no oócito ao final da maturação *in vitro*.

Figura 28 – Figura representando a quantidade de RNA total em grupos de oócitos desnudos maduros ao final da maturação *in vitro*.



Os pontos no gráfico representam a quantificação de cada grupo composto por 10 oócitos maduros. As barras de erro indicam o erro padrão da média. Fonte: Própria autoria.

5.4 Estudo 4: Modificações transcricionais em células do cumulus de oócitos bovinos causadas pela suplementação de vesículas extracelulares pequenas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral.

5.4.1 Expressão relativa de transcritos da via de sinalização PI3K-Akt e da via de transporte de RNA em células do cumulus

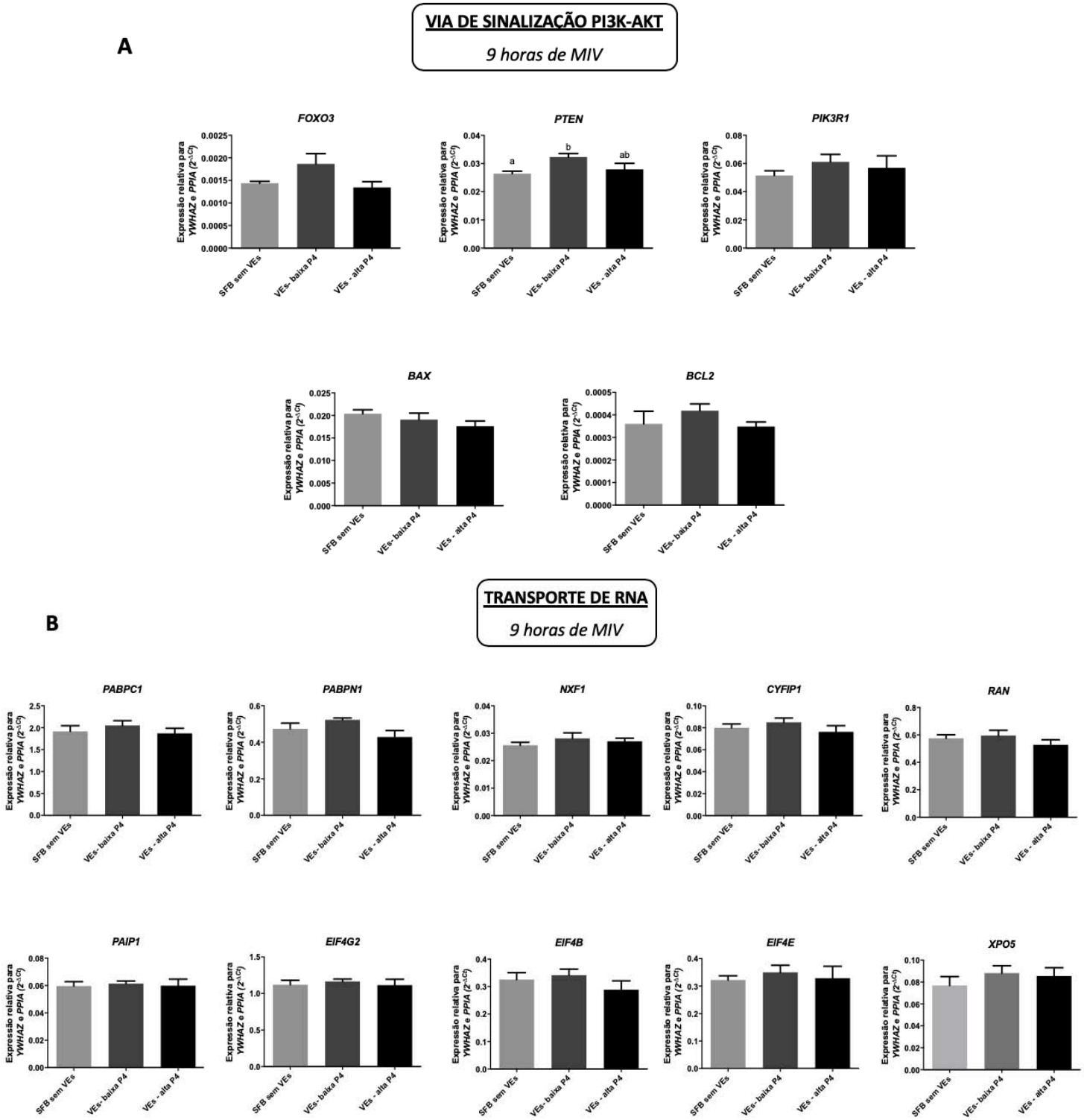
De acordo com os resultados de bioinformática dos miRNAs carregados por VEs pequenas do FF, a via PI3K-Akt e a via de transporte de RNA podem estar sendo moduladas. A via de sinalização PI3K-Akt é uma importante via relacionada a processos de síntese proteica, sobrevivência celular e ciclo celular. Além disso, sua

modulação em células foliculares pode ser utilizada como indicativo de qualidade oocitária, como demostrado por Andrade et al. (2017b). A via de transporte de RNA também foi considerada importante para este estudo, visto que a qualidade oocitária depende do acúmulo de RNA, além de influenciar a estabilização das moléculas de RNA e a tradução em proteínas. Portanto, este experimento teve objetivo de avaliar transcritos relacionados à via de sinalização PI3K-Akt (*FOXO3, PTEN, PIK3R1, BAX e BCL2)* e transcritos relacionados à via de transporte de RNA (*PABPC1, PABPN1, NXF1, CYFIP1, RAN, PAIP1, EIF4G2, EIF4B, EIF4E e XPO5)* em células do cumulus após 9 e 24 horas de maturação *in vitro* suplementadas apenas com SFB sem VEs ou com adição de VEs pequenas de folículos expostos à baixa ou à alta concentração de P4.

Os resultados demostraram que em 9 horas de maturação *in vitro* há aumento do transcrito *PTEN* quando os CCOs foram maturados na presença de VEs pequenas sob baixa P4 em comparação aos CCOs maturados apenas com SFB sem VEs (figura 29 A). Já os transcritos relacionados com a via de transporte de RNA não apresentaram mudanças no momento 9 horas de maturação *in vitro* (figura 29 B). Em contrapartida, os transcritos da via de sinalização PI3K-Akt não apresentaram diferença em células do cumulus após 24 horas de maturação (figura 30 A). Entretanto o transcrito *eukaryotic initiation factor 4E* (*EIF4E)* apresentou aumento em células do cumulus suplementadas com VEs pequenas do grupo alta P4 em comparação aos CCOs suplementados apenas com SFB sem VEs ao final a maturação *in vitro* (figura 30 B).

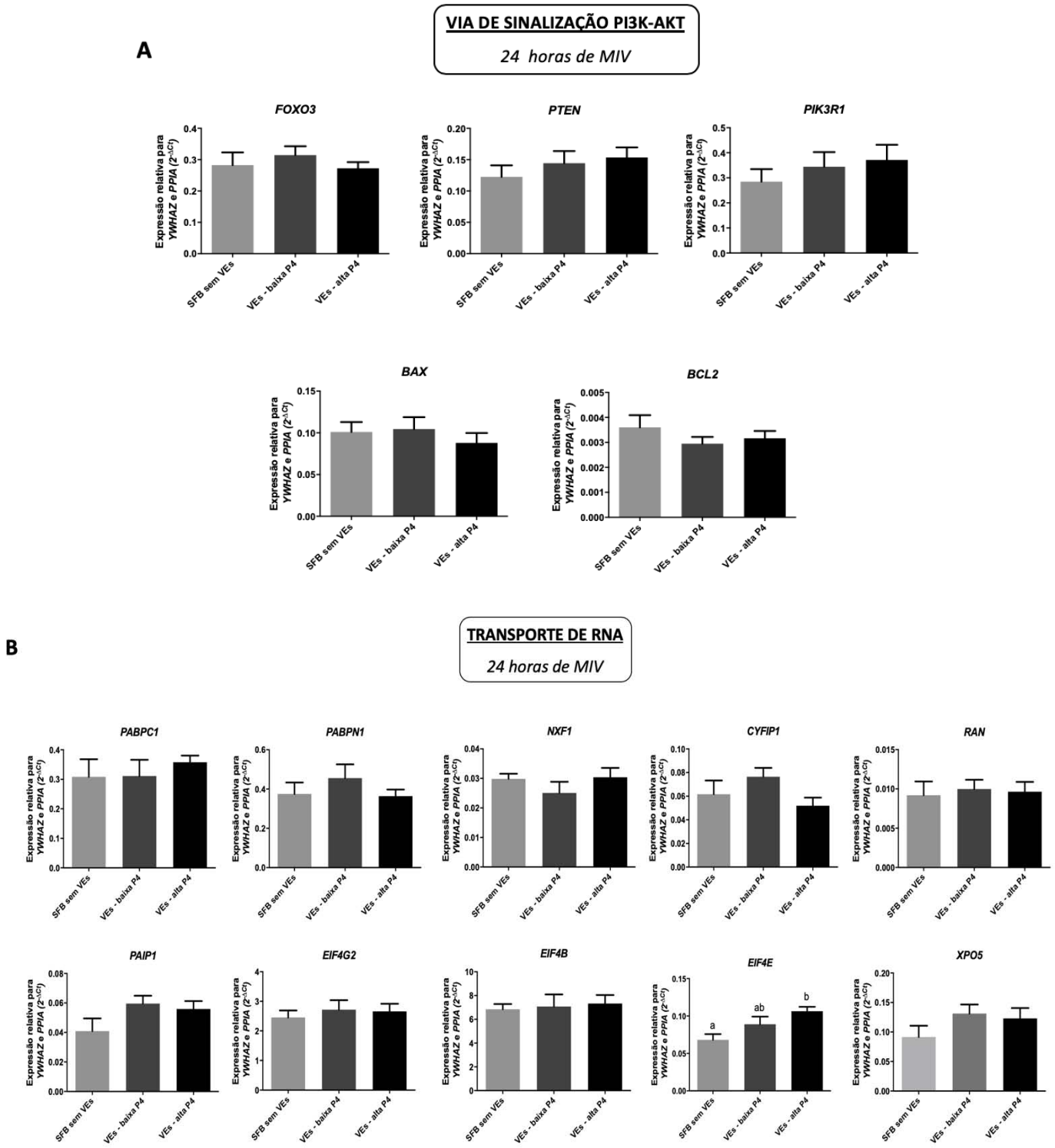
Em conclusão, a partir deste experimento foi possível verificar que a suplementação com VEs pequenas do fluido de folículos é capaz de modular transcritos da via PI3K-Akt após 9 horas de maturação *in vitro*, bem como transcritos da via de transporte de RNA após 24 horas de maturação *in vitro*.

Figura 29 – Representação gráfica da expressão relativa de transcritos da via PI3K-Akt e de transporte de RNA em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro*.



(A) Expressão relativa de transcritos da via PI3K-Akt e **(B)** da via de transporte de RNA em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro*. Os valores foram normalizados utilizando os endógenos YWHAZ e PPIA. Os gráficos demonstram os valores transformados ($2^{-\Delta Ct}$). As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias (± EP). As letras diferentes indicam $p < 0,05$. Fonte: Própria autoria.

Figura 30 – Representação gráfica da expressão relativa de transcritos da via PI3K-Akt e de transporte de RNA em células do cumulus após 24 horas de maturação *in vitro*.

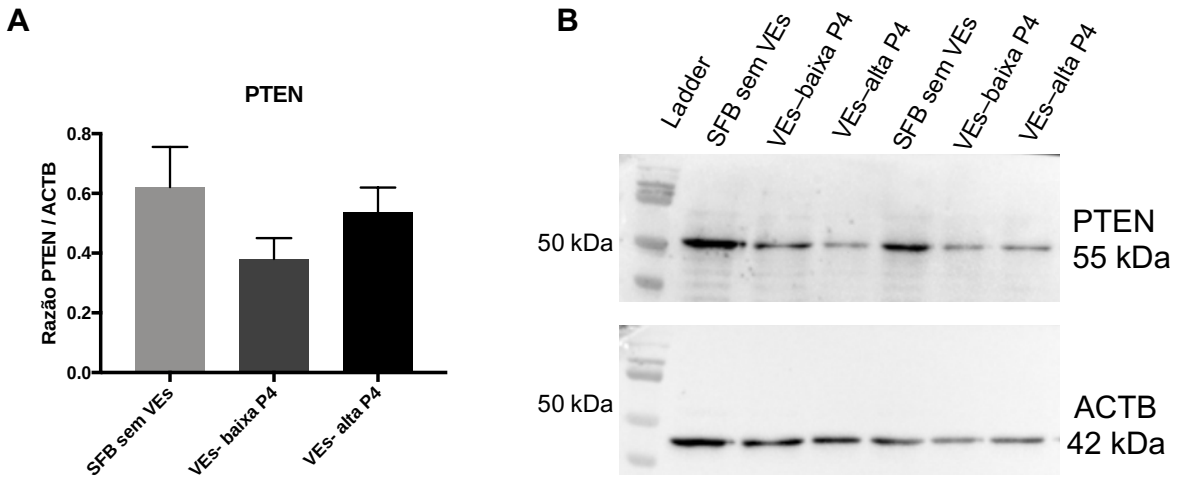


(A) Expressão relativa de transcritos da via PI3K-Akt e **(B)** da via de transporte de RNA em células do cumulus após 24 horas de maturação *in vitro*. Os valores foram normalizados utilizando os endógenos YWHAZ e PPIA. Os gráficos demonstram os valores transformados ($2^{-\Delta Ct}$). As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias (± EP). As letras diferentes indicam $p < 0,05$. Fonte: Própria autoria

5.4.2. Quantificação da proteína PTEN em células do cumulus após diferentes suplementações durante a maturação *in vitro*

Após avaliação transcricional de células do cumulus, foi realizada quantificação da proteína PTEN nestas células em 9 horas de maturação *in vitro* suplementadas com SFB sem VEs ou VEs pequenas de fluido de folículos sob baixa e alta P4. Esta proteína foi escolhida, visto que é um fator central na via de sinalização PI3K-Akt, capaz de inibir esta via, a qual também influencia a tradução de RNA em proteína (EIF4E). As médias da abundância da proteína foram 0,62 ± 0,13 no grupo SFB sem VEs, 0,38 ± 0,06 no grupo VEs-baixa P4 e 0,53 ± 0,08 no grupo VEs-alta P4. Apesar do perfil inverso em relação ao resultado da expressão relativa do RNAm de *PTEN*, os resultados indicaram que não há diferença nas médias da proteína PTEN em células do cumulus submetidas a diferentes suplementações (figura 31).

Figura 31- Representação da quantificação da proteína PTEN em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro* suplementada com SFB sem VEs ou VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4.



(A) Representação gráfica da razão da proteína PTEN sobre o endógeno ACTB. As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias. **(B)**

Representação das bandas de proteína PTEN (55 kDa) e ACTB (42 kDa) resultadas da técnica de *western blotting* em células do cumulus (duas réplicas por grupo) oriundas de diferentes suplementações durante a maturação *in vitro*. Fonte: própria autoria.

5.4.3 O perfil de miRNAs em células do cumulus após suplementação com vesículas extracelulares pequenas

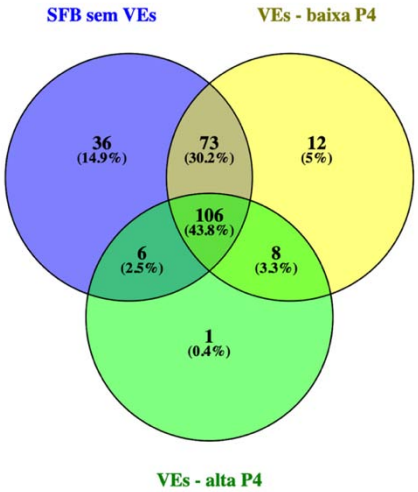
O perfil de miRNAs maduros foi avaliado em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro* suplementadas com SFB sem VEs pequenas ou com SFB sem VEs pequenas e adição de VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4. Este experimento foi realizado visto que as VEs pequenas possuem importante número de miRNAs, como descrito no estudo 1, os quais podem ser entregues e processados por células do cumulus, gerando modulação de vias biológicas, como a via de sinalização PI3K-Akt e de transporte de RNA.

Os resultados mostraram que células do cumulus de CCOs maturados com SFB sem VEs pequenas ou suplementados com VEs pequenas dos grupos baixa ou alta P4 apresentam diferente perfil de miRNAs maduros. O total de 221 miRNAs foram detectados nas células suplementadas com SFB sem VEs; 199 miRNAs foram detectados em células do cumulus suplementadas com VEs pequenas do grupo baixa P4 e 121 detectados em células do cumulus do grupo suplementadas com VEs pequenas do grupo alta P4. O total de 106 miRNAs maduros foram comuns entre todos os grupos. Ademais, 73 miRNAs estavam comuns entre os grupos SFB sem VEs e VEs pequenas do grupo baixa P4; seis miRNAs estavam comuns entre os grupos SFB sem VEs e VEs pequenas do grupo alta P4 e oito miRNAs estavam comuns entre os grupos suplementados com VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4 (apêndice F; figura 32).

Dentre os miRNAs comuns entre os grupos, 17 miRNAs foram detectados com diferentes níveis de expressão relativa ($p<0,05$). Destes, três miRNAs são preditos como reguladores de *PTEN* (bta-miR-181a, bta-miR-500 e bta-miR-584) e dois são preditos como reguladores de *EIF4E* (bta-miR-450b e bta-miR-197, $p<0,05$) e possuem padrão de expressão inverso em relação aos seus alvos, o que indica uma possível modulação dos transcritos *PTEN* e *EIF4E* por estes miRNAs (figura 33). Portanto, a partir destes resultados é possível concluir que as diferentes suplementações de CCOs durante 9 horas de maturação *in vitro* são capazes de influenciar o perfil de miRNAs maduros em células do cumulus. Adicionalmente,

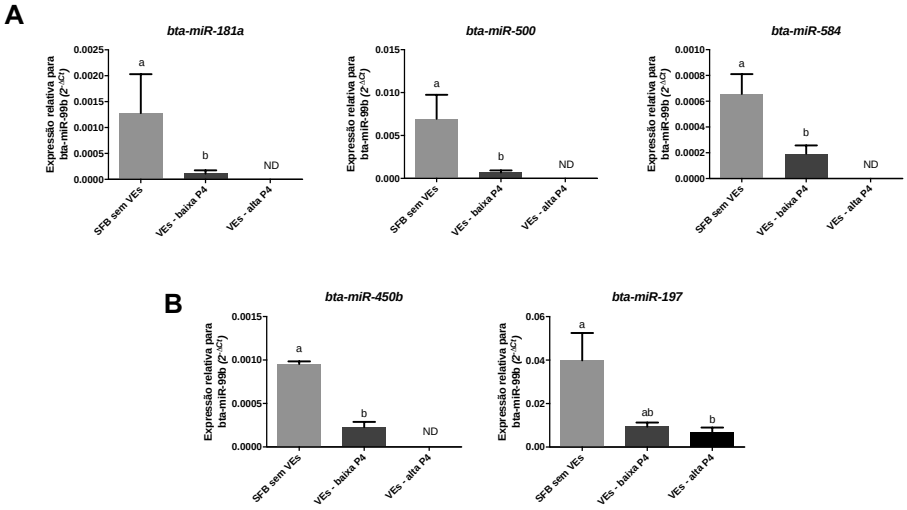
miRNA diferentes entre os grupos são possíveis moduladores de transcritos como *PTEN* e *EIF4E*, visto que a abundância dos miRNAs é inversa ao que foi encontrado nestes transcritos.

Figura 32 – Diagrama de Venn representando o perfil de miRNAs maduros encontrado em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro* com suplementação apenas de SFB sem VEs ou com VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4.



Fonte: Própria autoria.

Figura 33 – Representação gráfica dos miRNAs maduros diferentes entre células do cumulus expostas a diferentes suplementações que possuem *PTEN* e *EIF4E* como preditivos alvos e expressão relativa inversa aos seus alvos.



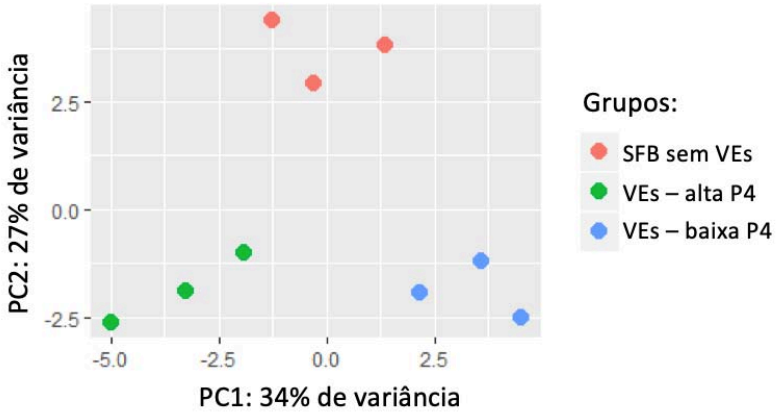
(A) miRNAs cujo *PTEN* é predito como alvo. (B) miRNAs cujo *EIF4E* é predito como alvo. Os valores foram normalizados utilizando o endógeno bta-miR-99b. Os gráficos demonstram os

valores transformados ($2^{-\Delta Ct}$). As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias (± EP). As letras diferentes indicam p <0,05. ND= não detectado. Fonte: Própria autoria.

5.4.4 O perfil de RNAs em células do cumulus após suplementação com vesículas extracelulares pequenas

O perfil de RNAs foi avaliado em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro* suplementadas apenas com SFB sem VEs ou com VEs pequenas dos grupos baixa ou alta P4 (n=3 grupos de células do cumulus por tratamento). Inicialmente, a análise de componentes principais (*Principal Componente Analysis – PCA*) demonstrou que os grupos de células analisados são distintos de acordo com o tipo de suplementação, explicando 61% da variância (PCA1= 34% e PCA2= 27%). Além disso, as amostras de cada grupo apresentam-se homogêneas de acordo com esta análise (figura 34).

Figura 34 – Análise de componentes principais dos grupos de células do cumulus suplementadas apenas com SFB sem VEs ou com VEs pequenas dos grupos baixa ou alta P4 durante 9 horas de maturação *in vitro.*

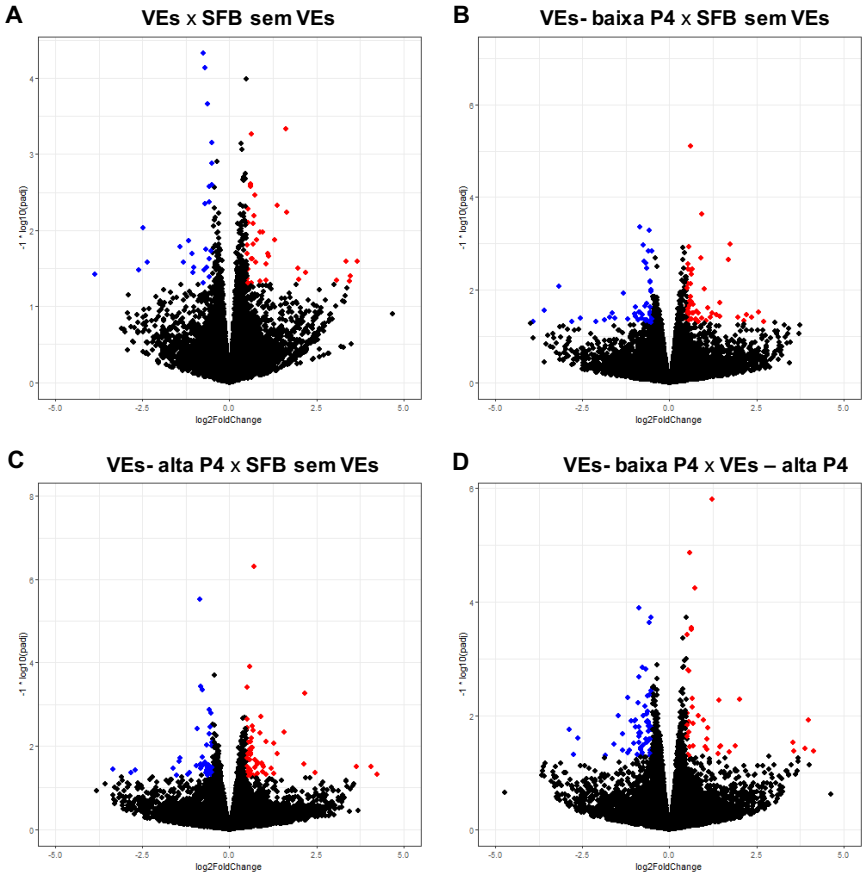


Fonte: Própria autoria.

Adicionalmente, foram avaliados os genes diferencialmente expressos entre os grupos. Os resultados mostraram que em 9 horas de maturação *in vitro* há diferença na abundância de genes expressos por células do cumulus de acordo com diferentes suplementações, como representado nos gráficos *Volcano plots* (figura 35). Quando comparados os grupos de células suplementadas com VEs pequenas, independente

do nível de P4, e o grupo suplementado apenas com SFB sem VEs, 62 genes estavam aumentados nos grupos suplementados com VEs pequenas e 48 genes diminuídos. Quando analisado o contraste entre o grupo de células suplementadas com VEs do grupo baixa P4 ou apenas com SFB sem VEs foram detectados 77 genes aumentados no grupo VEs – baixa P4, enquanto 75 estavam diminuídos. Já no contraste entre o grupo de células do cumulus suplementadas com VEs do grupo alta P4 ou apenas com SFB sem VEs foram encontrados 69 genes aumentados no grupo VEs- alta P4 e 64 genes estavam diminuídos. Por fim, o contraste entre os grupos de células suplementadas com VEs do grupo baixa P4 ou alta P4 apresentaram 63 genes aumentados no grupo VEs- baixa P4 e 76 genes estavam diminuídos. Os genes diferencialmente expressos entre os contrastes encontram-se no apêndice G.

Figura 35 – Gráficos *Volcano plot* representando os genes diferencialmente expressos entre os contrastes em células do cumulus que foram suplementadas com SFB sem VEs ou VEs pequenas dos grupos baixa ou alta P4 durante 9 horas de maturação *in vitro*.

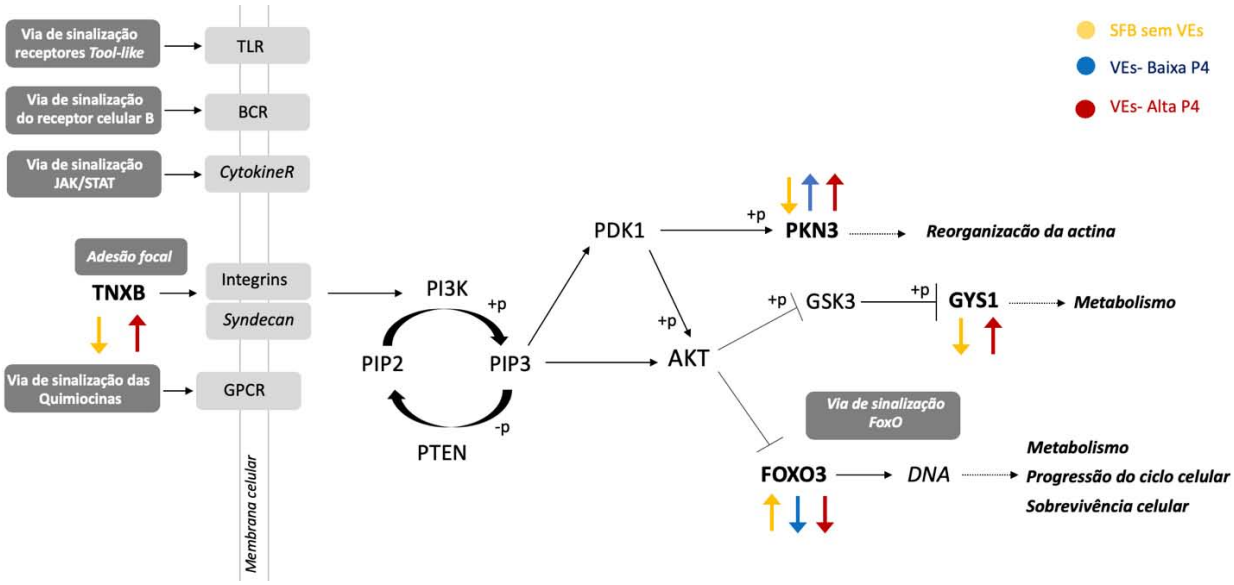


Os pontos vermelhos representam os genes diferencialmente expressos que estão aumentados no primeiro grupo, enquanto os pontos azuis representam os genes diminuídos

em comparação ao segundo grupo nomeado em cada gráfico. Os gráficos demonstram a distribuição de genes entre os contrastes **(A)** de células do cumulus suplementadas com VEs pequenas, independente da sua origem de folículos, ou com SFB sem VEs apenas; **(B)** células do cumulus suplementadas com VEs do grupo baixa P4 em comparação ao grupo SFB sem VEs **(C)** células do cumulus suplementadas com VEs do grupo alta P4 em comparação ao grupo SFB sem VEs e **(D)** células do cumulus suplementadas com VEs pequenas dos grupos baixa ou alta P4. Fonte: Própria autoria.

Dentre os genes diferencialmente expressos entre os grupos, foram analisados precisamente aqueles que fazem parte da via PI3K-Akt. Os resultados mostraram que a abundância de *forkhead box O3 (FOXO3), glycogen synthase* (*GYS1), protein kinase N 3* (*PKN3)* e *tenascin XB* (*TNXB)* são diferentes de acordo com as suplementações durante a maturação *in vitro*. *FOXO3* está diminuído quando há suplementação de VEs dos grupos baixa e alta P4 em comparação ao SFB sem VEs. *GYS1* está aumentado quando há suplementação de VEs do grupo alta P4 em comparação ao SFB sem VEs. *PKN3* está aumentado quando há suplementação de VEs do grupo baixa e alta P4 em comparação ao grupo SFB sem VEs. Por fim, *TNXB* está aumentado quando há suplementação de VEs do grupo alta P4 em comparação ao SFB sem VEs. A modulação da via a partir da análise de RNAseq em células do cumulus após diferentes suplementações está esquematizada na figura 36.

Figura 36- Representação simplificada da via de sinalização PI3K-Akt e as modulações de seus componentes em células do cumulus após as diferentes suplementações durante a maturação in *vitro*.

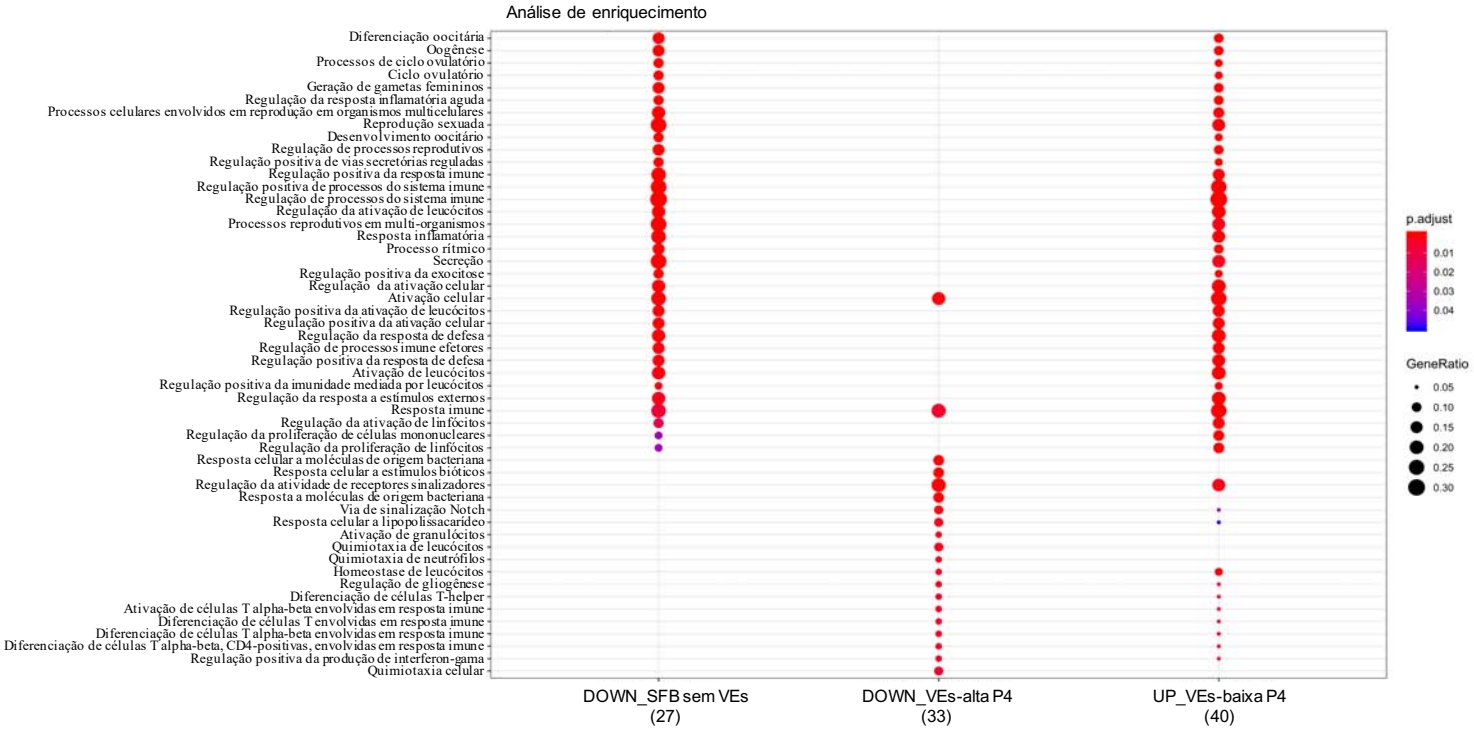


Genes marcados em negrito são diferencialmente expressos em células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs (amarelo), VEs do grupo baixa P4 (azul) e VEs do grupo alta P4 (vermelho). Setas para cima indicam que os genes estão aumentados e setas para baixo indicam que os genes estão diminuídos de acordo com a análise por RNAseq (p-ajustado <0,1). Fonte: Própria autoria.

As análises de enriquecimento funcional demonstraram que há 52 processos biológicos modulados em células do cumulus de forma distinta após as diferentes suplementações durante a maturação *in vitro* (figura 37). Os resultados foram baseados nos genes diferencialmente expressos entre os grupos, considerando aqueles sempre aumentados ou sempre diminuídos entre todos os contrastes e os processos em que estão relacionados. Em resumo, processos biológicos relacionados a processos reprodutivos como de diferenciação oocitária, oogênese, processos de ciclo ovulatório, geração de gametas femininos, reprodução sexuada, desenvolvimento oocitário, e regulação de processos reprodutivos, estão aumentadas em células do cumulus suplementadas com VEs pequenas do grupo baixa P4 em comparação ao grupo suplementado apenas com SFB sem VEs. Além disso, diversos processos biológicos relacionados à resposta imune, estão aumentados em células do cumulus suplementadas com VEs pequenas do grupo baixa P4 em comparação

ao grupo suplementado apenas com SFB sem VEs. Em especial, os processos de ativação celular e resposta imune estão aumentados no grupo de células suplementadas com VEs do grupo baixa P4 e diminuídos nos grupos de células suplementadas com VEs do grupo alta P4 e SFB sem VEs. Ademais, processos de regulação de atividade de receptores sinalizadores, a via de sinalização Notch e processos relacionados à quimiotaxia, diferenciação e ativação celular estão diminuídos em células do cumulus suplementadas com VEs pequenas do grupo alta P4 e aumentadas em células suplementadas VEs pequenas do grupo baixa P4.

Figura 37 – Representação da análise de enriquecimento funcional de processos biológicos em células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs apenas ou VEs pequenas de folículos sob alta ou baixa P4.

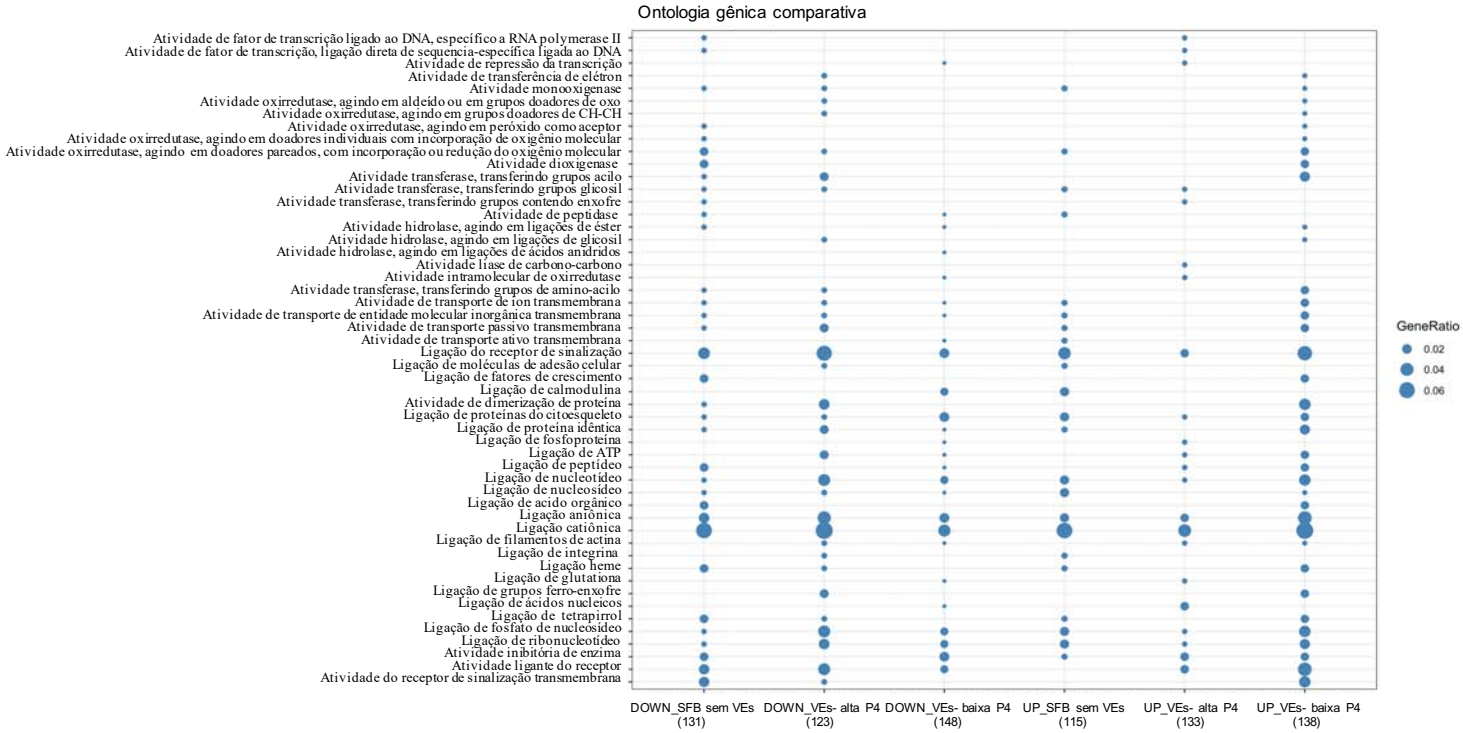


Os pontos indicam os processos biológicos modulados. A cor indica o valor de p-ajustado (p.ajust) e o tamanho dos pontos indica o número de genes envolvidos nas vias (GeneRatio), de acordo com os valores determinados em cada grupo no eixo X. DOWN=genes diminuídos no processo biológico e UP=genes aumentados no processo biológico, considerando p-ajustado <0,01. Os resultados foram obtidos a partir da avaliação de genes sempre aumentados (up) ou sempre diminuídos (down) em todos os contrastes possíveis. Fonte: Própria autoria.

Em seguida, foram realizadas análises de ontologia gênica comparativa baseadas em funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos. O

estudo das funções moleculares demonstrou maior número de resultados de interesse fisiológico (figura 38). Entre as vias de interesse, os resultados demonstraram maior relação com atividade transcricional em células do cumulus que tiveram contato com VEs pequenas do grupo alta P4, enquanto aquelas que foram suplementadas apenas com SFB sem VEs tiveram menor regulação de funções relacionadas à atividade transcricional. A função molecular de ligação de fatores de crescimento está aumentada no grupo de células suplementadas com VEs pequenas do grupo baixa P4 e diminuído nos grupos de células suplementadas apenas com SFB sem VEs. A função de ligação de ácidos nucleicos está aumentada em células suplementadas com VEs do grupo alta P4 e diminuída no grupo baixa P4. Por fim, as funções de atividade de sinalização mediada por receptor transmembrana estão aumentadas em células suplementadas com VEs do grupo baixa P4 e diminuídas em células suplementadas com VEs do grupo alta P4 ou SFB sem VEs.

Figura 38- Ontologia gênica comparativa entre células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs ou VEs pequenas de folículos sob alta ou baixa P4.



Os pontos indicam as funções moleculares envolvidas em cada grupo experimental. O tamanho dos pontos indica o número de genes envolvidos nas funções (GeneRatio), de acordo com os valores determinados em cada grupo no eixo X. DOWN= funções com regulação diminuída e UP= funções com regulação aumentada. Fonte: Própria autoria.

Em conclusão, a partir deste estudo exploratório foi possível avaliar que as células do cumulus de oócitos expostos a suplementações apenas com SFB sem VEs ou VEs dos grupos alta e baixa P4 durante a maturação *in vitro* possuem perfis distintos de RNAs. Ademais, foi possível verificar que as diferentes suplementações induzem mudanças de modulação de vias biológicas e funções moleculares em apenas 9 horas de maturação *in vitro*. Estes resultados indicam que as diferentes suplementações são capazes de afetar processos que influenciam a maturação oocitária.

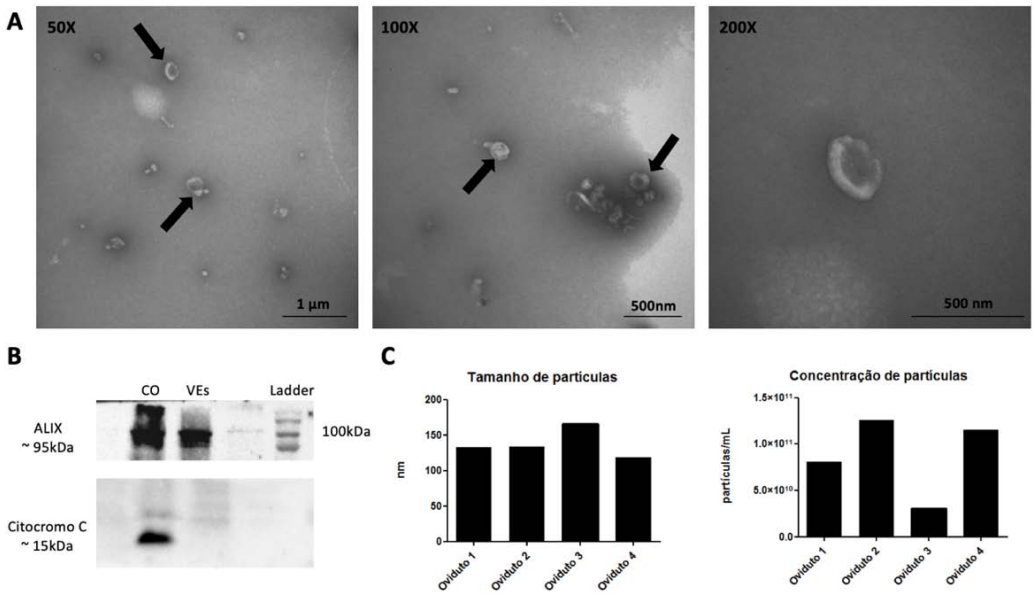
5.5 Estudo 5: Caracterização e uso de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino na suplementação de complexos cumulus-oócitos e espermatozoides durante a fertilização in vitro.

5.5.1 Caracterização de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino

Este estudo foi realizado com objetivo de, além de utilizar VEs pequenas do FF durante a maturação *in vitro*, também suplementar o meio de fertilização *in vitro*, uma importante etapa para o sucesso da produção de embriões *in vitro*. Portanto, os lúmens de ovidutos bovinos obtidos de abatedouro foram lavados com solução 1xPBS livre de cálcio e magnésio. As VEs pequenas foram isoladas deste lavado e utilizadas para caracterização.

Os resultados demonstraram que as VEs obtidas deste lavado apresentam morfologia e tamanho compatível às VEs pequenas, menores que 150nm, de acordo com as análises de microscopia eletrônica de transmissão. Adicionalmente, foi demonstrada a presença da proteína específica ALIX no *pellet* de VEs pequenas obtidas do lavado do oviduto, bem como em células do oviduto, e presença da proteína citocromo C, um indicador de presença de mitocôndria, apenas em células do oviduto. Ademais, as partículas avaliadas apresentaram média de tamanho e concentração de 137,75 ± 10,06 nm e $8{,}80 \times 10^{10} \pm 2{,}14 \times 10^{10}$ partículas/mL. A partir destes resultados foi possível validar o protocolo de obtenção de lavado do oviduto e isolamento de VEs pequenas deste fluido (figura 39).

Figura 39 – Caracterização de vesículas extracelulares pequenas obtidas do lavado de oviduto bovino.



(A) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a presença de VEs pequenas em formato de taça e menores que 150nm (setas pretas). **(B)** Representação da presença da proteína ALIX e citocromo C em células do oviduto (CO) e nas VEs pequenas obtido do lavado do oviduto (VEs). **(C)** Determinação do tamanho e concentração das VEs pequenas obtido do lavado de quatro ovidutos. As barras representam a quantificação em cada oviduto. Fonte: Própria autoria.

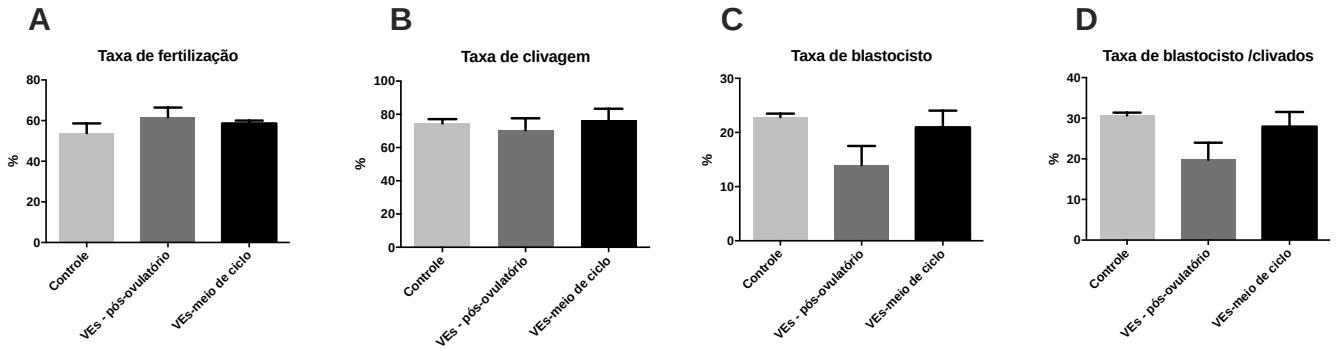
5.5.2 Efeito de vesículas extracelulares pequenas oriundas de ovidutos em estágio pós-ovulatório e em meio de ciclo estral na fertilização de CCOs e produção in *vitro* de embriões bovinos

As VEs pequenas do fluido de ovidutos obtidos em estágio pós-ovulatório e em meio de ciclo estral foram adicionadas no meio de fertilização *in vitro* para avaliação de efeitos em taxas de produção de embriões. Os grupos experimentais durante a fertilização *in vitro* foram: **1)** Sem suplementação com VEs (Controle); **2)** VEs pequenas de ovidutos em estágio pós-ovulatório e **3)** VEs pequenas de ovidutos em estágio de meio de ciclo. As diferentes origens de VEs pequenas de acordo com o ciclo estral foram utilizadas visando avaliar a necessidade do uso de ovidutos em estágio em que a fertilização ocorre fisiologicamente, ou seja, em estágio pós-ovulatório.

Os resultados demonstraram que não há diferenças entre as médias de taxas de fertilização, taxas de clivagem e taxas de produção de blastocistos quando os

meios de fertilização foram suplementados (figura 40 e tabela 3). Portanto, a partir destes resultados foi possível verificar que as diferentes suplementações durante a fertilização *in vitro* não impactaram as taxas de produção dos embriões produzidos *in vitro* no modelo utilizado.

Figura 40 – Representação gráfica das taxas de produção de embriões *in vitro* após suplementação com VEs pequenas oriundas de ovidutos em diferentes momentos do ciclo estral na etapa de fertilização.



(A) Taxa de fertilização de oócitos a partir da contagem de pro-núcleos. **(B)** taxa de clivagem no dia 3 de cultivo *in vitro*. **(C)** taxa de blastocistos no dia 7 de cultivo. **(D)** taxa de blastocistos no dia 7 de cultivo em relação ao número de estruturas clivadas no dia 3 de cultivo *in vitro*. As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias. Fonte: Própria autoria.

Tabela 3 - Representação das médias de taxa de fertilização, taxa de clivagem e taxa de produção de blastocistos após tratamento de CCOs e espermatozoides com VEs do oviduto em diferentes momentos do ciclo estral durante a fertilização *in vitro*.

Tratamento	*N[1]*	*Fertilização (%)*	*N[2]*	*Clivagem (%)*	*Blastocistos (%)*	*Blast. /clivados (%)*
Controle	77	53,86 ± 4,78	305	74,49 ± 2,48	22,83 ± 0,64	30,69 ± 0,70
VEs – pós-ovulatório	104	61,73 ± 4,67	306	70,46 ± 7,11	13,97 ± 3,54	19,73 ± 4,25
VEs – meio de ciclo	93	58,64 ± 1,42	292	76,34 ± 7,02	20,95 ± 3,09	27,93 ± 3,62
Total	**274**		**903**			

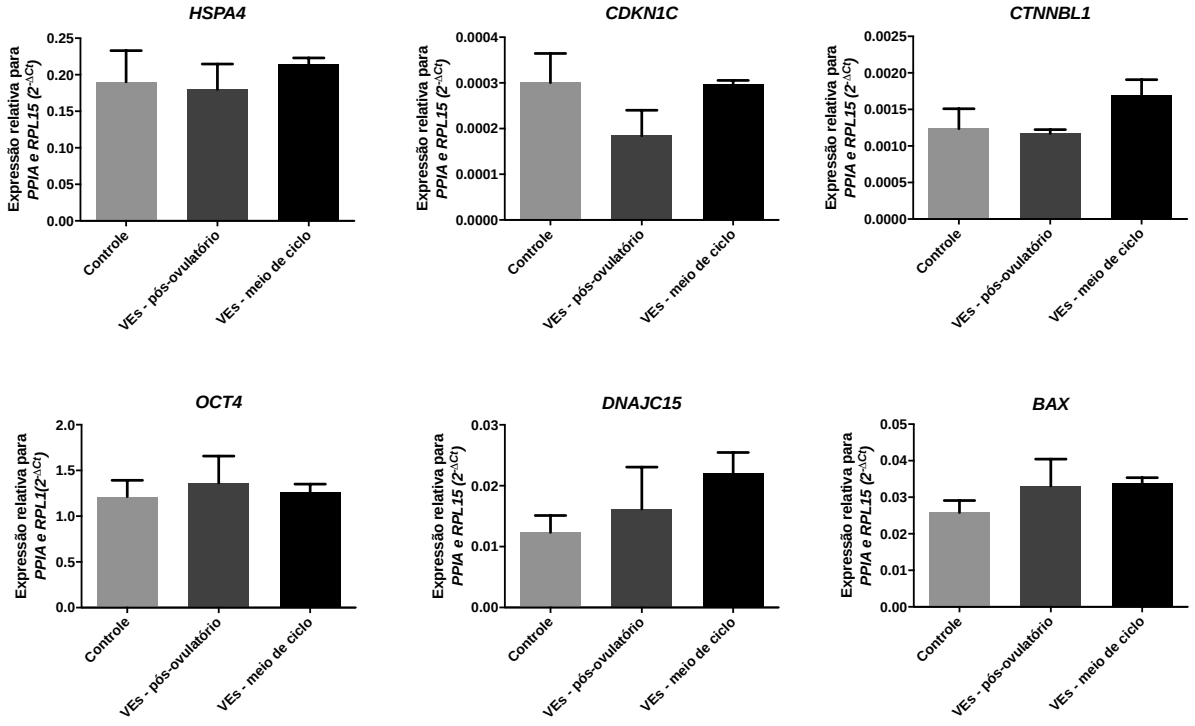
Legenda: N^1= número de possíveis zigotos em que foi avaliada presença de dois pro-núcleos; N^2 = número total de possíveis zigotos mantidos no cultivo *in vitro*. Os valores representam as médias e erro padrão. Fonte: Própria autoria

5.5.3 Avaliação da expressão relativa de transcritos relacionados à qualidade embrionária

A expressão relativa de transcritos relacionados à qualidade embrionária foi avaliada em grupos de 10 embriões produzidos *in vitro* (n= 3 *pools/* tratamento*)* oriundos da suplementação com VEs do oviduto de diferentes momentos do ciclo estral durante a fertilização *in vitro* ou ausência de suplementação*.* Este estudo foi realizado para avaliar se diferentes suplementações com VEs pequenas de ovidutos em estágio pós-ovulatório ou em meio de ciclo, ou apenas o meio de fertilização (ausência de VEs pequenas; controle), influenciam a qualidade dos embriões produzidos. Os transcritos avaliados foram descritos posteriormente como biomarcadores de embriões de melhor qualidade ou de embriões degenerados.

Os resultados demostraram que não há diferença na expressão relativa dos transcritos selecionados neste estudo (figura 41). Em suma, os transcritos *HSPA4*, *CDKN1C*, *CTNNBL1*, *OCT4*, *DNAJC15* e *BAX* apresentaram níveis de expressão relativa em todos os grupos, porém os transcritos *BMP4* e *BCL2* não foram detectados nesta análise. A partir da análise de expressão relativa destes grupos de embriões não foi possível detectar diferenças nos níveis de transcritos avaliados.

Figura 41 – Representação gráfica da expressão relativa de transcritos relacionados à qualidade embrionária em embriões do dia 7 de cultivo *in vitro* submetidos à suplementação de VEs pequenas durante a fertilização *in vitro*.



O grupo controle representa embriões originados de meio de fertilização sem suplementação com VEs pequenas. Já os grupos VEs representam embriões oriundos da fertilização na presença de VEs pequenas de ovidutos em estágio pós-ovulatório ou em meio de ciclo estral. Os valores foram normalizados utilizando os endógenos *PPIA* e *RPL15*. Os gráficos demonstram os valores transformados ($2^{-\Delta Ct}$). As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias (± EP). Fonte: Própria autoria.

6 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo consistem nos distintos perfis de miRNAs em VEs obtidas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral (estudo 1); da dinâmica entre VEs pequenas do FF e CCOs durante a maturação *in vitro* (estudo 2), bem como no envolvimento das VEs pequenas do FF como transportadoras de RNA para células do cumulus e influência da maturação *in vitro* no trânsito de RNA para o oócito (estudo 3). Ademais, demonstramos que as VEs pequenas de diferentes origens foliculares modulam as células do cumulus de forma distinta, podendo impactar importantes vias biológicas, como a via PI3K-Akt e de transporte de RNA, assim como processos biológicos e funções moleculares relacionadas à maturação oocitária, resposta imune e transcrição (estudo 4). As VEs pequenas do oviduto bovino foram caracterizadas, mas não impactaram taxas de produção e a abundância de transcritos avaliados em embriões no modelo de estudo utilizado (estudo 5). Desta forma, os resultados obtidos serão discutidos nas seguintes sessões.

6.1 Estudo 1: Caracterização de vesículas extracelulares pequenas oriundas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral bovino.

Vesículas extracelulares do FF são consideradas importantes moduladoras da comunicação intercelular no microambiente folicular. O primeiro estudo demonstrando a presença das VEs no FF foi descrito em 2012 e descreveu a presença de VEs contendo miRNAs e proteínas em éguas, além de sua internalização por células da granulosa quando adicionadas ao cultivo *in vitro* ou diretamente no ambiente ovariano por injeção intrafolicular (DA SILVEIRA et al., 2012). A partir de então, demais estudos caracterizaram e investigaram efeitos de VEs do fluido de folículos de diferentes origens, como em éguas ou mulheres de diferentes idades (DA SILVEIRA et al., 2012; DIEZ-FRAILE et al., 2014), folículos de tamanhos distintos em bovinos (HUNG et al., 2015, 2017; NAVAKANITWORAKUL et al., 2016) ou disfunções ovarianas como a

síndrome do ovário policístico em mulheres (SANG et al., 2013). Entretanto, até o momento, nenhum estudo havia explorado o efeito de diferentes estágios do ciclo estral no conteúdo de VEs do FF.

O folículo ovariano é um microambiente dinâmico e, portanto, folículos de tamanhos semelhantes são expostos a estímulos distintos ao longo do ciclo estral, como revisado por Adams et al (2008). Portanto, folículos ovarianos passam por fases de crescimento, de transição e de atresia (GRIMES; IRELAND, 1986; SINDEREWICZ et al., 2017). Estas fases são controladas por modificações hormonais que afetam as características morfológicas e bioquímicas dos folículos (ADAMS et al., 2008) e são acompanhadas por modificações das características do corpo lúteo, uma importante fonte de P4 (SARTORI; BARROS, 2011). O FF é composto por hormônios como P4, E2, insulina, IGFs, fatores secretados por oócitos e células do cumulus, bem como nutrientes e metabólitos (O'SHEA et al., 2012; ORSI et al., 2005). Portanto, as concentrações de diversos componentes são modificadas ao longo do ciclo estral.

No presente estudo foram avaliados os efeitos dos diferentes ambientes endócrinos nos tamanhos, concentrações e conteúdos de miRNAs de VEs. Para isso, ovários em estágios de início e meio do ciclo estral foram caracterizados de acordo com a aparência do corpo lúteo, determinados pelos estágios 1 e 3 respectivamente, como bem estabelecido por Ireland, Murphee e Coulson (1980), e o fluido de folículos pequenos foi coletado para caracterização de VEs pequenas. Inicialmente, o estágio do ciclo estral foi associado com as concentrações de E2 e de P4 do FF. Os resultados indicaram semelhante concentração de E2 entre os grupos de folículos aspirados, porém, o grupo em início de ciclo estral (estágio 1) apresentou menor concentração de P4 em comparação ao grupo de folículos obtidos em meio de ciclo estral (estágio 3). Sugere-se que a não variação de E2 ocorre pelo fato de o FF ser proveniente de folículos de mesmo tamanho, assim como demonstrado nos resultados de Navakanitworakul et al. (2016). De forma semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, Ireland, Coulson e Murphee (1979) demonstraram que as concentrações de progestinas em fluido de folículos de 3 a 9 mm de diâmetro aumentam entre os estágios 1 e 3 do ciclo estral bovino, apresentando médias de concentrações 65 ± 7 ng/mL e 167 ± 30 ng/mL, respectivamente, corroborando com o

aumento das concentrações de P4 em diferentes momentos do ciclo estral encontrado neste estudo.

Adicionalmente, a razão de E2 e P4 (E2/P4) foi utilizada para avaliação da atresia folicular. Os valores da razão E2/P4 >1, 1 a 0,01 e <0,01 são considerados para definição de folículos saudáveis, transicionais e atrésicos, respectivamente, assim como estabelecido por Grimes e Ireland (1986) e aplicado por Sinderewicz et al. (2017). Os resultados do presente estudo demonstraram que os grupos de fluido de folículos obtidos em início ou meio de ciclo estral apresentaram mesmo nível de atresia folicular, visto que não houve diferença entre as razões e, de acordo com classificação considerada, são enriquecidos por folículos em estágio transicional. Portanto, a partir do perfil hormonal, os grupos de FF foram denominados de folículos expostos à baixa e à alta P4, correspondentes aos estágios de início (estágio 1) e meio de ciclo estral (estágio 3), respectivamente.

O aumento da concentração de P4 no FF ao longo do ciclo estral é esperado, visto que após ovulação é formado o corpo lúteo, que passa por transformações morfológicas, causando o aumento progressivo da concentração de P4 entre os dias 1 e 4 do ciclo estral (IRELAND; COULSON; MURPHREE, 1979; SARTORI; BARROS, 2011). Além do corpo lúteo como importante fonte de P4, é importante constatar que o processo de esteroidogênese também ocorre em células da teca e granulosa, as quais contribuem para produção de P4 encontrada no FF (BAO; GARVERICK, 1998). Entretanto, baseado nas claras diferenças morfológicas do corpo lúteo entre os diferentes estágios do ciclo estral, acreditamos que o aumento da P4 no FF esteja relacionado ao aumento da atividade lútea. Além do aumento da concentração de P4 no FF, sua concentração circulante também aumenta entre o estágio 1 e 3 do ciclo estral (IRELAND; COULSON; MURPHREE, 1979). Portanto, as modificações da concentração de P4 foram utilizadas para associação aos diferentes momentos do ciclo estral. Visto que os pares de ovários são considerados uma única unidade, assim como descrito por Adams et al. (2008), e que o objetivo deste estudo foi avaliar os diferentes estágios do ciclo estral, foram utilizados ovários ipso e contralaterais ao corpo lúteo.

Após determinação de grupos de fluido de folículos previamente expostos a baixas e altas concentrações de P4, VEs pequenas foram isoladas a partir do

protocolo de centrifugações seriadas. Para validação do protocolo de isolamento foram realizadas análises da morfologia e tamanho de VEs, assim como presença e ausência de proteínas especificas, como recomentado por Théry et al. (2018). Os resultados demonstraram que o *pellet* de VEs obtidas do FF apresenta partículas com membrana de bicamada lipídica, em formato de taça e com tamanho menor que 150 nm, adequado para VEs pequenas. Adicionalmente, foi demonstrado que o *pellet* de VEs do FF assim como células foliculares possuem a proteína ALIX, envolvida na formação de vesículas internas de corpos multivesiculares. Em relação a proteína CALNEXINA, a mesma não está presente em VEs, porém está presente em células foliculares por ser um marcador de retículo endoplasmático. Estes resultados estão de acordo com as instruções estabelecidas pela "*International Society for Extracelular Vesicles*" e descrito no "*Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018)*" (THÉRY et al., 2018) e indicam o enriquecimento de VEs no *pellet* e ausência de contaminação celular.

Adicionalmente, foram realizadas análises de tamanho e concentração de partículas obtidas dos diferentes grupos de FF. Os resultados demonstraram que não há diferença no tamanho e concentração de partículas obtidas a partir do FF exposto a altas ou baixas concentrações de P4. Resultados prévios em que as VEs do FF bovino foram caracterizadas demonstraram características similares às descritas neste estudo. De maneira semelhante, Hung et al. (2015) demonstraram presença de VEs em formato côncavo e tamanho entre 50-200 nm de diâmetro a partir da microscopia eletrônica. O tamanho e concentração das partículas avaliado por NTA tiveram média de 142 e 128 nm de VEs coletadas de folículos pequenos (3 a 5 mm) e grandes (>9mm), respectivamente (HUNG et al., 2015). A concentração média de VEs encontradas em FF foi de 10^{12} partículas por mL, sendo que esta concentração diminui ao longo do crescimento folicular, apresentando maior concentração em folículos de menor diâmetro (3 a 5 mm) e menores concentrações em folículos médios (6 a 9 mm) e grandes (>9mm) (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016). Estes resultados demonstram que o tamanho e a concentração de VEs do FF estão de acordo com as análises realizadas neste estudo, que mostraram tamanho médio de 113,8 ± 4,70 nm e 123,62 ± 3,40 nm e concentração de $5,2 \times 10^{11} \pm 1,03 \times 10^{11}$ partículas/mL e $6,52 \times 10^{11} \pm 1,28 \times 10^{11}$ partículas/mL para VEs pequenas do grupo baixa e alta P4, respectivamente.

Visto que o protocolo de isolamento de VEs pequenas do FF foi bem estabelecido, o perfil de 383 miRNAs carregados por VEs obtidas de folículos dos grupos baixa e alta P4 foi avaliado. Os resultados demonstraram que apenas nove miRNAs da forma madura foram diferentes entre os grupos. As análises de bioinformática dos três miRNAs maduros aumentados no grupo VEs – baixa P4 (bta-miR-154a, bta-miR-339b e bta-miR-1287) não foram relacionadas com vias de sinalização de interesse. Porém, o miR-154 foi descrito em células da granulosa de éguas (DA SILVEIRA et al., 2012). Este miRNA possui papel importante no desenvolvimento embrionário (SU et al., 2010) e foi relacionado ao bloqueio do desenvolvimento embrionário inicial em ratos (WANG et al., 2013). O miR-339b foi descrito em VEs secretadas por CCOs de bovinos (ANDRADE et al., 2017a), além disso o miR-339-5p foi encontrado aumentado em oócitos em fase de vesícula germinativa de humanos em comparação aos maturados *in vitro* (XU et al., 2011) e também descrito em embriões de ratos no início do desenvolvimento (WANG et al., 2013). Já os seis miRNAs aumentados no grupo VEs-alta P4 (bta-miR-144, bta-miR-195, bta-miR-222, bta-miR-301b, bta-miR-433 e bta-miR-670) são possíveis reguladores de vias importantes para desenvolvimento folicular e maturação oocitária como PI3K-Akt, transporte de RNA, ciclo celular, Hippo, FoxO, meiose oocitária, TGF-beta, via de sinalização esteroidogênica, degradação de RNA, junção aderente, mTOR, metabolismo e síntese de ácidos graxos.

Quando avaliadas as formas maduras e precursoras de miRNAs concomitantemente, o total e 161 miRNAs foram encontrados diferentes entre os grupos, sendo todos eles aumentados no grupo de VEs expostos à baixa P4 em comparação ao grupo alta P4. As análises de bioinformática demonstraram que estes miRNAs aumentados em VEs do grupo baixa P4 também são potenciais reguladores de vias relacionados com desenvolvimento do folículo ovariano e maturação oocitária. Entre os top 20 miRNAs classificados de acordo com o menor valor de p foram encontradas vias como PI3K-Akt, endocitose, processamento de proteínas pelo retículo endoplasmático, Hippo, transporte de RNA, ciclo celular, FoxO, sobrevivência de RNAm, TGF-beta, interação do receptor ECM, mTOR, metabolismo e biossíntese de ácidos graxos e biossíntese de esteroides. Quando foram avaliados os top 100 miRNAs foram encontradas vias semelhantes, como via de sinalização MAPK, endocitose, transporte de RNA, Hippo, ciclo celular, FoxO, meiose oocitária, via de

sinalização estrogênica, maturação oocitária mediada pela P4, sobrevivência e degradação de RNAm, junções aderente, TGF-beta, junções gap e mTOR.

A partir destes resultados, sugerimos que os miRNAs da forma precursora possuem maior impacto na diferença dos perfis de VEs pequenas do fluido de folículos de diferentes origens e, consequentemente, na diferente modulação de vias biológicas em células receptoras. Isto porque há maior número de miRNAs da forma madura e precursora diferente entre as VEs pequenas em comparação aos miRNAs somente na forma madura. Ainda, os resultados indicam que VEs pequenas obtidas do grupo baixa P4 possuem maior modulação de vias biológicas em comparação ao grupo alta P4, já que todos os miRNAs maduros e precursores diferentes entre estes grupos encontram-se aumentados no grupo baixa P4.

Estudos recentes avaliando VEs de FF também demonstraram que perfis de miRNAs carregados por estas VEs são afetados quando comparadas fêmeas de diferentes idades (DA SILVEIRA et al., 2012; DIEZ-FRAILE et al., 2014; DA SILVEIRA et al., 2015b), com disfunções ovarianas como a síndrome do ovário policístico (SANG et al., 2013), em folículos em diferentes estágios do desenvolvimento (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016), em folículos que geraram oócitos com diferentes competência de fertilização e qualidade embrionária (MARTINEZ et al., 2018) e em folículos de mulheres com diferentes índices de massa corporal (MARTINEZ et al., 2019). Apesar destes estudos avaliarem VEs oriundas de microambientes foliculares expostos a diferentes condições fisiológicas e patológicas, estas condições podem ser associadas a mudanças de perfis hormonais que afetam o microambiente folicular. Adicionalmente, de forma semelhante ao presente estudo, modificações na composição de VEs pequenas oriundas de fluido do oviduto foram relacionadas a diferentes estágios do ciclo estral bovino, considerando estágios 1 a 4 (ALMIÑANA et al., 2018). Ainda, um estudo em ovelhas demonstrou que a P4 regula o conteúdo de miRNAs em VEs do lavado do lúmen uterino (BURNS et al., 2018).

Em conjunto, estes dados indicam que as VEs pequenas do FF possuem relação de regulação de vias biológicas importantes para manutenção de processos fisiológicos do ambiente folicular e do oócito. Em geral, estes processos estão relacionados com proliferação, diferenciação celular, apoptose e maturação oocitária (CHENG et al., 2015; CUNNINGHAM; ZHU; HAMMOND, 2004; GASPERIN et al.,

2015; KNIGHT; GLISTER, 2006; MACAULAY et al., 2016; RYAN et al., 2008). Assim como descrito no presente estudo, demais estudos que avaliaram possíveis vias biológicas que podem ser reguladas por miRNAs em VEs de FF demonstraram que mesmas vias estão envolvidas neste processo de comunicação mediado por VEs. As vias TGF-beta, adesão focal e MAPK foram descritas quando avaliadas VEs de FF de bovinos e de éguas (DA SILVEIRA et al., 2012; SOHEL et al., 2013), além das vias PI3K-Akt, ErbB e junção gap em VEs de FF de bovino (DA SILVEIRA et al., 2017). As vias biológicas mais reguladas por miRNAs em VEs do FF de humanos foram Wnt, MAPK, ErbB e TGF-beta (SANTONOCITO et al., 2014), bem como adesão focal, FoxO, meiose oocitária, PI3K-Akt e junções gap (MARTINEZ et al., 2019). Ainda, Andrade et al. (2017a) demonstraram que vias como PI3K-Akt, MAPK, Wnt, TGF-beta, junções gap e mTOR são reguladas por miRNAs exclusivos de VEs secretadas por células da granulosa, enquanto vias como PI3K-Akt, MAPK, adesão focal, endocitose, Wnt, TGF-beta e sobrevivência de RNAm são reguladas por miRNAs exclusivos de VEs secretadas por CCOs bovinos. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que miRNAs de VEs do FF são similares aos miRNAs encontrados em células da granulosa e CCOs e suas VEs secretadas em meio de cultivo, indicando que as VEs do FF são originadas de células do ambiente folicular. Desta forma, as análises da literatura validam os resultados encontrados no presente estudo, indicando que os miRNAs presentem em VEs secretadas no ambiente folicular são moduladores de vias comuns e que regulam funções fisiológicas neste ambiente.

6.2 Estudo 2: O uso de vesículas extracelulares pequenas como suplementação na maturação in vitro de complexos cumulus-oócitos bovinos.

A suplementação dos meios de maturação com VEs pequenas foi utilizada para avaliação da dinâmica da internalização destas VEs por CCOs e para estudo dos efeitos em taxas de produção de embriões *in vitro*. Os resultados do presente estudo demonstraram a entrada de VEs pequenas marcadas com corante PKH desde o início da etapa de maturação *in vitro*. Os vídeos de CCOs não fixados permitem sugerir que as VEs pequenas possuem importante função de entrega de moléculas para os CCOs.

A presença de VEs pequenas em células do cumulus é clara desde o início da maturação e se mostra dinâmica, visto à progressão das marcações de VEs pequenas ao longo das camadas das células do cumulus. A obtenção de imagens em tempo real permitiu analisar detalhes da comunicação entre VEs pequenas e CCOs durante a maturação *in vitro*, considerando que estudos anteriores demonstraram a presença de VEs marcadas em CCOs fixados, ou seja, limitaram-se a determinados momentos da maturação *in vitro*. Entretanto, de forma semelhante, estes estudos demonstraram a presença de VEs pequenas marcadas em células do cumulus de CCOs bovinos (DA SILVEIRA et al., 2017; HUNG et al., 2015).

Além da clara presença de VEs pequenas em células do cumulus, as imagens obtidas demonstram que VEs pequenas podem estar localizadas próximas às projeções intercelulares, como as TZPs, e ao citoplasma oocitário. De forma similar, Hung et al. (2015) e Da Silveira et al. (2017) citaram a presença de marcações correspondente a VEs pequenas na região da zona pelúcida, mas não relacionaram com as TZPs. Já Lange-Consiglio et al. (2017) demonstraram a incorporação de VEs de oviduto no citoplasma oocitário de cães após 72 horas de maturação *in vitro* (LANGE-CONSIGLIO et al., 2017). Um estudo recente registrou a presença de estruturas semelhantes a VEs localizada no cone da TZP de bovinos, próximo ao citoplasma oocitário, a partir da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, sendo que a imagem foi denominada “sinapse gamética”, visto sua semelhança com comunicações em sinapses neuronais (MACAULAY et al., 2014). Ainda neste estudo, foi sugerido que moléculas de RNA são enviadas a partir de células do cumulus de forma seletiva para o oócito através de TZPs. Sendo assim, os resultados do presente estudo sugerem que VEs pequenas são internalizadas por células do cumulus e, eventualmente, moléculas podem ser enviadas para o citoplasma oocitário de forma seletiva, visto que a frequência de VEs na região da zona pelúcida e do citoplasma oocitário foi menor em relação à quantidade de VEs encontradas em células do cumulus. Porém, mais estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos de entrega das VEs pequenas e de seus conteúdos para os diferentes compartimentos dos CCOs.

Após confirmação da internalização de VEs pequenas por CCOs e da permanência destas VEs durante todo período de maturação *in vitro*, as VEs obtidas de folículos expostos à baixa e à alta P4 foram utilizadas na suplementação da maturação *in vitro* para avaliação das taxas de maturação, de clivagem e de produção

de blastocisto *in vitro* em comparação ao grupo suplementado apenas com SFB sem VEs. Os resultados mostraram que não há diferença nas taxas de produção entre os diferentes grupos de tratamento. Baseado neste resultado, sugerimos que as diferenças de suplementação apenas durante a etapa de maturação *in vitro* não permitem a visualização de efeitos em taxas de produção. Isto porque, os CCOs e prováveis zigotos passam pelas etapas de fertilização e de cultivo *in vitro*, respectivamente, as quais duram 7 dias. Além disso, o cultivo *in vitro* suplementado com de 2,5 % de SFB sem VEs e o uso de CCOs de diversas origens pode ter impedido a visualização do efeito da suplementação de VEs. Desta forma, é possível que o longo período de cultivo nas condições citadas influencie na não detecção de diferenças entre os tratamentos.

Até o momento poucos estudos utilizaram suplementação de VEs pequenas de FF apenas durante a maturação *in vitro* para avaliação de taxas de produção de blastocistos *in vitro*. Recentemente, foi demonstrado que a suplementação de VEs do FF durante a maturação *in vitro* protegeu os CCOs do efeito negativo causado pelo estresse térmico, gerando aumento em taxas de clivagem e de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (RODRIGUES et al., 2019). Entretanto, não houve aumento em taxas de produção quando as VEs suplementaram CCOs não expostos ao estresse térmico (RODRIGUES et al., 2019), indicando a recuperação dos CCOs mediada por VEs quando previamente afetados pelo calor. O aumento em taxas de produção de embriões bovinos foi descrito quando VEs do fluido de folículos de 3 a 6 mm foram suplementadas durante as etapas de maturação e de cultivo *in vitro* concomitantemente (DA SILVEIRA et al., 2017). Além disso, a suplementação do cultivo *in vitro* com VEs obtidas do lavado do lúmen de ovidutos bovinos demonstrou aumento em taxas de produção de embriões no dia 7 apenas quando utilizou VEs que haviam sido congeladas previamente em comparação com VEs não congeladas e ao controle (sem suplementação com VEs; ALMIÑANA et al., 2017). Ademais, foi demonstrado que a adição de SFB no cultivo *in vitro* recupera taxas de blastocisto no dia 7 quando comparado ao cultivo sem o SFB e apenas com adição de VEs oriundas do oviduto bovino (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017). Desta forma, acreditamos que a suplementação de VEs pequenas somente na etapa de maturação *in vitro* utilizando CCOs de diferentes origens foliculares e na presença de SFB sem VEs durante o cultivo *in vitro*, não permitiu constatarmos modificações em taxas de produção de embriões produzidos *in vitro*.

6.3 Estudo 3: O impacto da suplementação de vesículas extracelulares pequenas no transporte de RNA em complexos cumulus-oócitos bovinos durante a maturação in vitro.

O estudo do envolvimento de VEs no transporte de RNA para CCOs foi realizado baseado no fato de que as VEs são importantes carreadoras de RNA (VALADI et al., 2007) e considerando que o acúmulo de RNA no citoplasma oocitário é um processo fundamental para maturação oocitária, já que o RNA acumulado pelo oócito suporta o início do desenvolvimento embrionário até ativação do seu genoma (SIRARD et al., 2006). Como suporte para este estudo, a análise do perfil de miRNAs carregados por VEs do FF indicou que a via de transporte de RNA pode estar sendo regulada. Então, o transporte de RNA foi avaliado utilizando diferentes técnicas em compartimentos do CCO (células do cumulus, zona pelúcida e oócito).

Inicialmente foi realizado estudo qualitativo para avaliação da internalização de VEs do FF cujo RNA total foi marcado com corante específico. Os resultados mostraram clara presença de VEs marcadas em células do cumulus desde a primeira hora de maturação *in vitro*, as quais persistiram durante todo período de captura de imagens. Os CCOs que foram suplementados apenas com o diluente de VEs pequenas previamente corado não apresentaram nenhum tipo de marcação semelhante. Desta forma, evidenciamos a partir da coloração do RNA das VEs pequenas a entrega de RNA para células do cumulus de bovinos. A marcação do RNA total das VEs utilizando esta mesma técnica foi realizada em estudos utilizando outros tipos celulares, como células mesenquimais, os quais demonstraram a transferência de RNAs em VEs para células receptoras (COLLINO et al., 2015; LINDOSO et al., 2014). Apesar de escassa demonstração da entrega de moléculas de RNA marcadas em VEs de FF na literatura por meio de imagens, a transferência de RNAm e miRNAs específicos carregados por VEs do FF para células da granulosa já foi evidenciada (DA SILVEIRA et al., 2014; SOHEL et al., 2013).

A presença de RNA na região da zona pelúcida de CCOs foi descrita pela primeira vez por Macaulay et al. (2014), em que demonstraram moléculas de RNA localizadas nas TZPs, além da contribuição das células do cumulus para envio destas moléculas (MACAULAY et al., 2014). A comunicação entre células do cumulus e oócitos mediada por miRNAs já foi sugerida, visto que alvos de miRNAs encontrados em células do cumulus são abundantes em oócito de humanos (ASSOU et al., 2013).

Desta forma, consideramos que a suplementação com VEs pequenas do FF possa modular o transporte de RNA em células do cumulus e então afetar o transporte entre essas células e o oócito. Os resultados demonstraram que as moléculas de RNA marcadas durante da maturação estão presentes na região da zona pelúcida, assim como demonstrado por Macaulay et al. (2016). Foi possível identificar o efeito do tempo de maturação dos CCOs no aumento de RNA localizado na região da zona pelúcida, sendo que os oócitos maturados durante 2 e 4 horas em sistema *in vitro* apresentaram maior média de moléculas de RNA em comparação aos oócitos imaturos. Este resultado está de acordo com os resultados da literatura, em que demonstraram aumento progressivo do RNA na região da TZP desde 0 a 4 horas de maturação *in vitro* (MACAULAY et al., 2016). A partir deste estudo não foi possível detectar efeito da suplementação das VEs pequenas do FF na quantidade de moléculas de RNA na região da zona pelúcida. Entretanto, sugerimos que o tempo desde a coleta no abatedouro e o transporte dos ovários até o processamento dos CCOs e a heterogeneidade do estágio de maturação dos CCOs possam influenciar este resultado.

Por fim, foi realizada a quantificação de RNA total em oócitos maduros previamente suplementados com VEs de folículos expostos à baixa e à alta concentração de P4 e desnudados. Os resultados obtidos indicaram que não fomos capazes de detectar diferença na quantidade de RNA acumulado no oócito. Estes resultados corroboram com os resultados anteriores que demonstram que a suplementação com VEs não induz o aumento do transporte de RNA desde as células do cumulus através da zona pelúcida.

Em conjunto, os resultados indicam que, a partir das técnicas utilizadas, a suplementação com VEs durante a maturação *in vitro* pode não afetar a quantidade do RNA, mas sugere que pode modificar qualitativamente os RNAs que são transferidos para os compartimentos dos CCOs. Em suporte a esta sugestão, demonstramos nos estudos prévios que as VEs possuem importante conteúdo de miRNAs que é modificado de acordo com a origem folicular e que as VEs pequenas são ativamente internalizadas por células do cumulus, o que pode impactar a modulação dos CCOs e o conteúdo entregue para o oócito, já que os RNA nascentes nas células do cumulus são transportados em direção ao oócito pelas TZPs (MACAULAY et al., 2016).

6.4 Estudo 4: Modificações transcricionais em células do cumulus de oócitos bovinos causadas pela suplementação de vesículas extracelulares pequenas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral.

O presente estudo refere-se a uma ampla investigação de modificações transcricionais em células do cumulus após suplementação com VEs pequenas de folículos expostos a baixas e altas concentrações de P4 ou apenas com SFB sem VEs. Este estudo tem suporte em resultados prévios, os quais demonstraram que as VEs pequenas de diferentes origens foliculares possuem diferente perfil de miRNAs (estudo 1), são internalização por células do cumulus (estudo 2), mas não afetaram a quantidade de RNA em CCOs bovinos (estudo 3). As células do cumulus estão em íntimo contato com o oócito e são uma importante fonte de RNA (MACAULAY et al., 2014, 2016). Portanto, as modificações nestas células podem ter impacto no conteúdo de RNA enviado para o oócito e na competência oocitária, podendo ser uma forma de aprimorar a maturação *in vitro*.

Inicialmente, as vias de sinalização PI3K-Akt e a via de transporte de RNA foram investigadas pontualmente a partir da análise de expressão relativa de alguns transcritos centrais das vias. Estas vias foram escolhidas a partir dos resultados de vias biológicas preditas como moduladas por miRNAs carregados por VEs do FF (estudo 1). Além disso, foram consideradas visto a relevância no ambiente folicular e na competência oocitária.

A via de sinalização PI3K-Akt possui importantes funções no ambiente folicular em diversas fases do seu desenvolvimento. A ativação desta via está diretamente relacionada com a ativação de folículos primordiais *in vitro*, sendo capaz de gerar oócitos maduros em camundongos e mulheres (LI et al., 2010). Em resumo, a via PI3K-Akt é ativada por estímulos extracelulares, como a partir de fatores de crescimento e citosinas, que aumentam a atividade da enzima *PI3-kinase* (PI3K), a qual converte *phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate* (PIP2) em *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (PIP3 ;CECCONI et al., 2012). Então, a fosforilação da proteína quinase *AKT serine/threonine kinase* (Akt*)* ocorre a partir da ativação de diversos fatores, entre eles o *phosphoinositide-dependent kinase* (PDK1). PTEN é um fator central inibidor da via, o qual inibe a conversão de PIP2 para PIP3. Quando ativada, a Akt inibe fatores como *glycogen synthase 3 beta* (GSK3), FOXO, *BCL2 associated agonist of cell death* (BAD) e *caspase 9* (Casp9). No ambiente ovariano, a ativação da

via modula fatores como crescimento, sobrevivência, proliferação e metabolismo celular (CECCONI et al., 2012).

No presente estudo, foi demonstrado aumento dos níveis de expressão relativa do RNAm *PTEN* em 9 horas de maturação *in vitro* em células do cumulus suplementadas com VEs do grupo baixa P4 em comparação às células suplementadas apenas com SFB sem VEs. Enquanto em 24 horas de maturação *in vitro* não houve alteração dos transcritos relacionados a esta via. Os resultados na literatura quanto à expressão relativa de transcritos desta via em células do cumulus ainda são escassos. Foi demonstrado em bovinos que o aumento de *PTEN* em células foliculares (sem enriquecimento para células do cúmulos) está relacionado com oócitos bovinos que não se desenvolvem a blastocisto *in vitro* (ANDRADE et al., 2017b). Já em análises de células do cumulus de oócitos de mulheres após maturação *in vivo* foi demonstrado uma diminuição de transcritos da via PI3K-Akt dos oócitos que deram origem à gestação (ARTINI et al., 2017). Neste mesmo estudo foi demonstrado que transcritos da via PI3K-Akt como os *FoxO* 1, 3 e 4 variam em células do cumulus de camundongos de acordo com o tempo de maturação. Isto sugere que há uma variação da modulação da via de acordo com o tempo de maturação. Portanto, é importante considerar que estes estudos foram realizados em modelos distintos, utilizando diferentes tipos celulares e em diferentes momentos da maturação. Apesar disso, os estudos indicam que a via de sinalização PI3K-Akt parece estar envolvida nos processos de competência oocitária.

A via de transporte de RNA está relacionada com diversas etapas de modificações da molécula de RNA, as quais regulam seu transporte do núcleo ao citoplasma, além de sua estabilização e preparação para tradução (STEWART, 2019). No presente estudo, os transcritos da via de transporte de RNA não foram modificados em 9 horas de maturação *in vitro*, porém foi detectado aumento da expressão relativa do transcrito *EIF4E* em células do cumulus suplementadas com VEs do grupo alta P4 em comparação ao grupo suplementado apenas com SFB sem VEs após 24 horas de maturação *in vitro*.

O EIF4E faz parte do complexo iniciador de tradução. A principal função de sua proteína é de proteção ao RNAm, em conjunto com EIF4G e PABP1. Esta interação forma uma estrutura circular do RNAm, o qual é protegido da degradação por nucleases e induz a maquinaria de tradução (GRAY; GORGONI, 2004). Em estudo exploratório utilizando modelos de qualidade oocitária foi demonstrada a importância

dos processos de síntese proteica e sua regulação para competência oocitária (O'SHEA et al., 2012). Ademais, um estudo demonstrou que a expressão relativa de *EIF4E* é diminuída em células do cumulus de oócitos de camundongos com baixa competência oocitária (VIGONE et al., 2013). Desta forma, sugerimos que a adição de VEs pequenas modulem a via de transporte de RNA, permitindo uma maior tendência à tradução de RNA em células do cumulus suplementadas com VEs do grupo alta P4 quando comparado ao controle ao final da maturação.

Após investigação de transcritos de interesse nas células do cumulus, foi realizada a avaliação da proteína PTEN nestas mesmas células após 9 horas de maturação *in vitro*, já que esta proteína é uma importante controladora da via de sinalização PI3K-Akt, a qual também afeta a síntese proteica mediada por EIF4E. Os resultados mostraram que os níveis de proteína PTEN foram inversos aos encontrados na análise de sua expressão relativa de RNAm no mesmo momento. Entretanto, de maneira diferente da análise dos transcritos, não foi constatada diferença nos níveis de proteína PTEN entre os grupos, sugerindo a necessidade de análises dos níveis de proteínas em outros momentos da maturação assim como possíveis efeitos da atuação de miRNAs.

Em seguida, o perfil de 383 miRNAs na forma madura foi avaliado em células do cumulus expostas a diferentes suplementações durante 9 horas de maturação *in vitro*. Este estudo foi realizado visto que as VEs pequenas do FF apresentaram importante número de miRNAs (estudo 1), os quais podem ser entregues e processados pelas células do cumulus e podem regular alvos de interesse, como *PTEN* e *EIF4E.* Inicialmente, os resultados mostraram distintos perfis de miRNAs nestas células. O total de 17 miRNAs apresentaram diferentes níveis de expressão entre os grupos. Curiosamente, todos os miRNAs estavam aumentados no grupo de células suplementadas com SFB sem VEs, como visto nos gráficos do apêndice F (C), exceto o bta-miR-27a-5p que estava aumentado em células suplementadas com VEs do grupo alta P4 em comparação aos demais grupos de células. O maior número de miRNAs no grupo de células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs em comparação às células suplementadas com VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4 sugere ação das VEs pequenas em impedir a transcrição de demais miRNAs nas células do cumulus ou de seus miRNAs realizarem sua função biológica seguido de degradação no momento de 9 horas de maturação *in vitro.* No estudo 1, o miRNA bta-miR-27a-5p estava presente em VEs pequenas do grupo baixa e alta P4, mas

aumentado em VEs do grupo baixa P4. Desta forma, o aumento do miRNA em células do cumulus indica sua transferência por VEs pequenas. Porém, sugerimos que o processamento dos miRNAs seja influenciado pela maquinaria das células receptoras e pelo conjunto de moléculas das VEs pequenas recebidas por estas células, o que pode justificar a maior quantidade deste miRNA em células do cumulus suplementadas com VEs do grupo alta P4. O miRNA bta-miR-27a-5p foi descrito em células da granulosa e em CCOs de bovinos, assim como em VEs secretadas por células da granulosa, mas não de CCOs (ANDRADE et al., 2017a). Além disso, este miRNA foi demonstrado de forma abundante em VEs oriundas de folículos pequenos (3 a 6 mm) de bovinos (DA SILVEIRA et al., 2017). O miR-27a-5p foi considerado prevalente em FF de mulheres com oócitos maduros (MACHTINGER et al., 2017). Entretanto, também foi encontrado aumentado em células do cumulus de mulheres com síndrome do ovário policístico (XU et al., 2015). Portanto, está relacionado com funções no folículo ovariano e pode ser transportado para os CCOs por VEs pequenas.

Quando analisados os miRNAs diferentes entres as células do cumulus encontramos três miRNAs que são preditivos reguladores de *PTEN* (bta-miR-181a, bta-miR-500 e bta-miR-584) e dois que são preditivos reguladores de *EIF4E* (bta-miR-450b e bta-miR-197), além de terem perfil inverso aos seus alvos. A partir destes resultados, sugerimos que estes miRNAs estejam regulando *PTEN* em 9 horas de maturação *in vitro* e possivelmente afetam *EIF4E* em 24 horas de maturação *in vitro*.

Para aprimorar os resultados encontrados, foi realizada análise global de RNA nas células do cumulus expostas a diferentes suplementações durante 9 horas de maturação *in vitro* utilizando a técnica de sequenciamento de RNA. Inicialmente, foi avaliada a distribuição das amostras a partir do PCA, que indicou que as diferentes suplementações durante a maturação *in vitro* geram diferentes perfis de RNAs em células do cumulus, explicando 61% da variância dos resultados, e que as amostras dos mesmos grupos são semelhantes entre si. Em seguida, foram avaliados os genes diferencialmente expressos entre contrastes. Os resultados indicaram que em apenas 9 horas de maturação *in vitro* as diferentes suplementações influenciam a abundância de genes em células do cumulus quando comparados todos os contrastes. De forma importante, foi visto que somente a adição de VEs pequenas do FF, independente de sua origem, modifica o total de 110 genes em células do cumulus quando comparadas a células suplementadas apenas com SFB sem VEs. Quando adicionadas VEs do

grupo baixa P4 152 genes foram diferentes e quando adicionadas VEs do grupo alta P4 133 genes foram diferentes quando comparadas com células suplementadas apenas com SFB sem VEs. Ainda, quando comparada a suplementação com VEs pequenas isoladas de folículos de diferentes origens, ou seja, expostos à baixa ou à alta concentração de P4, houve diferença em 139 genes em células do cumulus.

Os resultados na literatura referentes à modulação de células do ambiente ovariano após suplementação com VEs mostram que a adição de VEs de folículos pequenos (3 a 5 mm) causou aumento em transcritos envolvidos com expansão das células do cumulus de bovinos (*PTGS2*, *PTX3* e *TNFAISP6*) em comparação aos CCOs suplementados com VEs de folículos grandes (>9mm) ou sem VEs (HUNG et al., 2015). De forma semelhante, dentre os genes diferencialmente expressos no presente estudo, encontramos que *PTGS2* está aumentado em células que foram suplementadas com VEs do grupo baixa P4 em relação às células suplementadas apenas com SFB sem VEs. Também foi demonstrado que a suplementação de CCOs durante a maturação *in vitro* com VEs de FF de vacas submetidas ao estresse ou conforto térmico modifica o perfil transcricional de células do cumulus e oócitos (MORALES DALANEZI et al., 2019). A adição de VEs de FF em cultivo de células da granulosa de éguas demonstrou regulação de componentes da via de sinalização TGF-beta nestas células (*ACVR1*e *ID2*; DA SILVEIRA et al., 2014). Além de miRNAs presente em VEs do FF poderem mediar estas modificações, é possível que outras moléculas, como proteínas, sejam entregues para células receptoras, como sugerido por Da Silveira et al. (2014). Recentemente, foi descrito que a adição de VEs do FF de bovinos modificou o perfil de proteínas de células da granulosa (HUNG et al., 2017). Desta forma, é importante elucidar que as mudanças encontradas em células do cumulus podem estar relacionadas com os diferentes perfis de miRNAs carregado pelas VEs, mas diversas moléculas em VEs como RNAs, proteínas e lipídios, podem ter influência direta na modulação do perfil de RNAs. Além disso, foi demonstrado que a internalização de VEs é modificada de acordo com a dimensão folicular, o que indica que as mudanças encontradas no presente estudo podem estar relacionadas também com o fato das VEs serem diferentemente internalizadas (HUNG et al., 2017).

Após análise global do perfil dos RNAs em células do cumulus, genes da via de sinalização PI3K-Akt foram investigados na análise de RNAseq para esclarecimento da modulação da via de acordo com diferentes suplementações, baseado nos resultados de *PTEN* e *EIF4E* descritos anteriormente. Os resultados

mostraram que os níveis de *FOXO3* estão diminuídos em células do cumulus tratadas com VEs pequenas dos grupos de baixa e alta P4 quando comparados com células que foram suplementadas apenas com SFB sem VEs. Já os níveis de *PKN3* estão aumentados em células do cumulus suplementadas com VEs pequenas dos grupos de baixa e alta P4 em comparação com as células suplementadas apenas com SFB sem VEs. Os transcritos *GYS1* e *TNXB* apresentam-se aumentados em células suplementadas com VEs pequenas do grupo alta P4 em comparação com células suplementadas apenas com SFB sem VEs.

Quando o perfil destes genes é avaliado em conjunto na via de sinalização PI3K-Akt, como demonstrado na figura 36, é sugestivo que a via esteja ativa quando suplementada com VEs pequenas independente do estágio do ciclo estral. Isto porque, os resultados indicam que o componente Akt, um fator central da via, esteja ativado em células que tiveram contato com VEs pequenas. Em resumo, a ativação de Akt promove sobrevivência celular a partir da fosforilação de moléculas como FOXO3, o qual é inativado, suprimindo a transcrição de genes relacionados com morte celular (BRUNET et al., 1999). Quando a via é ativada estimula PDK1, o qual ativa Akt (ALESSI et al., 1997), assim como PKN, envolvido na indução da reorganização do citoesqueleto celular (DONG et al., 2000). A Akt ativa também controla o metabolismo celular inibindo GSK3-beta que, consequentemente, ativa GYS, estimulando a síntese de glicogênio (FRAME; COHEN, 2001). Por fim, o gene TNXB é responsável pela síntese de proteínas de matriz extracelular que são envolvidas no processo de adesão focal e modulam a via PI3K-Akt (BRISTOW et al., 1993; YAN et al., 2019). Em resumo, FOXO3 e GYS1 são afetados pela ativação da Akt, enquanto PKN3 é produto da ativação de PDK1, o qual é um dos fatores que ativa Akt, e TNXB pode modular a ativação da via.

Resultados similares foram descritos na literatura, os quais demonstraram que a suplementação com VEs é capaz de afetar a via PI3K-Akt em células receptoras. VEs do FF de bovinos aumentaram a atividade de PI3K-Akt em células da granulosa (HUNG et al., 2017). Neste mesmo estudo a ativação da via foi relacionada ao aumento da proliferação celular em resposta à suplementação com VEs de fluido de folículos pequenos. Estudos recentes também demonstraram que VEs secretadas por células tronco mesenquimais e células de câncer têm potencial em aumentar a atividade da via PI3K-Akt em células receptoras (ARSLAN et al., 2013; QU et al., 2009). Desta forma, visto que a ativação da via está relacionada com a ativação de

folículos primordias (LI et al., 2010), é importante considerar o uso destas VEs como ferramentas em técnicas de reprodução assistida.

Em seguida, análises exploratórias foram realizadas utilizando enriquecimento funcional e ontologia gênica. A análise de enriquecimento funcional apontou importantes processos biológicos relacionados com regulação de eventos reprodutivos, entre eles diferenciação oocitária, oogêsene, geração de gametas e desenvolvimento oocitário, que estão aumentados em células do cumulus suplementadas com VEs do grupo baixa P4. A modulação destes processos pode estar associada com o grande número de miRNAs carregados por VEs do grupo baixa P4 (estudo 1), os quais apresentaram vias preditivas que se relacionam com os processos biológicos descritos, como vias de sinalização que influenciam o desenvolvimento folicular (PI3K-Akt, MAPK, Hippo, FoxO, WNT, TGF-beta, etc) e até mesmo as vias de meiose oocitária e maturação oocitária mediada por P4. Apesar do maior número de miRNAs estar associado aos processos de silenciamento de vias, a partir do presente resultado hipotetizamos que os miRNAs de VEs pequenas do grupo baixa P4 atuem aumentando a regulação das vias biológicas.

Além disso, os resultados demonstraram que as VEs pequenas do grupo baixa P4 estão envolvidas na maior regulação de resposta imune em relação às células suplementadas apenas com VEs do grupo SFB sem VEs. Especificamente, os processos de ativação celular e resposta imune estão aumentados em células suplementadas com VEs do grupo baixa P4 em comparação com células suplementadas com SFB sem VEs e com VEs do grupo alta P4. A resposta imune no ambiente folicular está associada com a ovulação e a expansão de células do cumulus, as quais se assemelham ao processo inflamatório (RICHARDS; LIU; SHIMADA, 2008). Estudos demonstraram aumento progressivo de transcritos relacionados à função imune especificamente em células do cumulus em comparação a células da granulosa após indução da ovulação em camundongos (HERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2006). Sabe-se que o ambiente folicular pré-ovulatório assemelha-se aos folículos em atresia inicial (SIRARD et al., 1999). Portanto, apesar de os folículos pequenos expostos à baixa P4 (em estágio pós-ovulatório do ciclo estral) não serem fisiologicamente semelhantes aos folículos pré-ovulatório, eles podem mimetizar processos que ocorrem neste ambiente devido aos mecanismos de atresia inicial. Essas observações corroboram com o estudo que demonstrou que os miRNAs

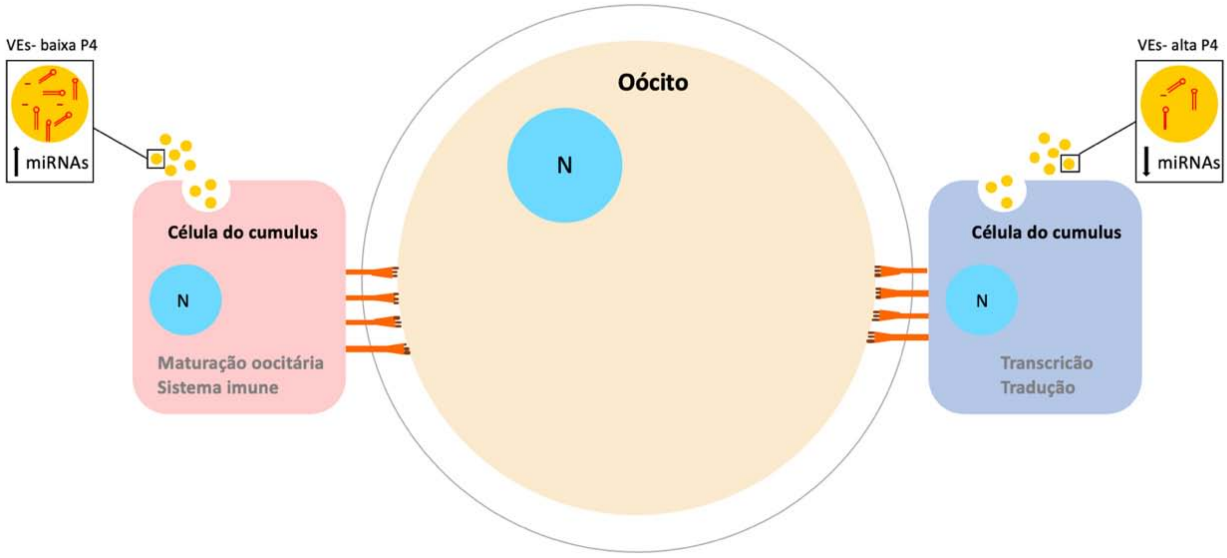
abundantes em VEs de folículos grandes regulam processos inflamatórios em comparação às VEs de folículos pequenos, independente do estágio do ciclo estral (HUNG et al., 2017), podendo indicar que os folículos grandes avaliados tenham características semelhantes aos folículos ovulatório em comparação aos folículos pequenos. Portanto, esta abordagem indica que as VEs obtidas de folículos expostos à baixa P4 possam estar modulando os CCOs de forma semelhante ao que ocorre em folículos pré-ovulatórios em comparação aos folículos obtidos em onda folicular exposta à alta P4. Além disso, é importante considerar que o aumento da resposta imune pode estar relacionado à resposta da entrada de VEs em células do cumulus, já que estas células adquirem funções de fagocitar partículas como fragmentos de matriz, espermatozoides e partículas extracelulares (RICHARDS; LIU; SHIMADA, 2008).

A análise de enriquecimento funcional também indicou que a via de sinalização Notch está diminuída em células do cumulus suplementadas com VEs do grupo alta P4 em comparação às células suplementadas com VEs do grupo baixa P4. A via de sinalização Notch está envolvida com o desenvolvimento de folículos, assim como intermediando as interações entre as células foliculares, como revisado por Vanorny e Mayo (VANORNY; MAYO, 2017). Estudos demonstraram que a inativação de fatores que estimulam esta via em células da granulosa comprometeu a maturação meiótica oocitária de camundongos e os tornam inférteis (HAHN et al., 2005). Esta via pode ser influenciada por modificações hormonais, sendo que os maiores níveis de P4, correspondente ao período do meio da gestação em camundongos, inibem alguns componentes desta via em ovários dos fetos e interferem na formação de folículos primordiais (GUO et al., 2012). Baseado nestes resultados, sugerimos que as diferenças hormonais modifiquem as células foliculares e consequentemente as VEs secretadas por elas, o que pode afetar a via de sinalização Notch em células receptoras.

As análises de ontologia gênica demonstraram que diversas funções moleculares reguladas pelos RNAs nas células do cumulus são modificadas após diferentes suplementações, o que pode afetar o oócito. Além disso, essas funções podem ter relação com os resultados prévios deste estudo. As células suplementadas com VEs do grupo alta P4 apresentaram aumento nas funções relacionadas à

transcrição. Este resultado pode ser associado ao fato de essas células terem maior expressão relativa de *EIF4E* em 24 horas de maturação *in vitro*, ou seja, a maior atividade transcricional em 9 horas de maturação *in vitro* pode exigir uma maior estabilização e tradução de moléculas de RNA ao final da maturação. Ademais, células do cumulus suplementadas com VEs do grupo baixa P4 apresentaram maior regulação de função de ligação de fatores de crescimento em comparação às células suplementadas apenas com SFB sem VEs. Esta função está relacionada com ligação de fatores de crescimento em receptores celulares que estimulem sua atividade, portanto esta função pode estar associada com o fato de VEs do grupo baixa P4 apresentarem maior modulação de processos biológicos relacionados à maturação oocitária e resposta imunológica nas análises de enriquecimento funcional, já que estes processos dependem de fatores de crescimento para serem ativados. A partir deste estudo, criamos um modelo hipotético que integra os resultados gerados até o momento (figura 42). A hipótese gerada a partir dos resultados obtidos é que VEs pequenas de folículos expostos à baixa P4 possuem maior abundância de miRNAs, os quais estão associados à maior modulação de vias e processos biológicos relacionados à maturação oocitária e à resposta imune. Já as VEs pequenas de folículos expostos à alta P4 possuem menor abundância de miRNAs e estão regulando vias associadas a processos de transcrição e tradução. Desta forma, demonstramos que VEs pequenas de diferentes origens foliculares possuem papeis distintos nas células do cumulus, mas ambas podem ser benéficas aos CCOs e por isso podem ser aplicadas em diferentes momentos da maturação *in vitro*.

Figura 42- Modelo hipotético gráfico representando o efeito da suplementação de VEs pequenas no CCO durante a maturação *in vitro*.



Vesículas extracelulares do fluido de folículos expostos a ambientes endócrinos distintos geram diferentes respostas moleculares em células do cumulus. Vesículas extracelulares pequenas oriundas de folículos expostas à baixa concentração de P4 apresenta maior abundância de miRNAs e maior modulação de vias relacionada à maturação oocitária e ao sistema imune. VEs pequenas oriundas de folículos expostos à alta concentração de P4 possuem menor abundância de miRNAs e modulam vias relacionadas à transcrição e tradução. N=núcleo da célula. Fonte: Própria autoria.

6.5 Estudo 5: Caracterização e uso de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino na suplementação de complexos cumulus-oócitos e espermatozoides durante a fertilização in vitro.

Este estudo foi realizado pra avaliar o efeito de VEs do oviduto bovino durante a etapa de fertilização *in vitro*. O estudo é baseado no fato de que no oviduto ocorre a etapa final de maturação meiótica oocitária, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial, como revisado por Maillo et al. (2016), portanto as sinalizações mediadas por VEs podem impactar estes processos. As interações entre VEs do oviduto, gametas e embriões foram descritas recentemente na literatura (AL-DOSSARY; STREHLER; MARTIN-DELEON, 2013; ALMIÑANA et al., 2017; LANGE-CONSIGLIO et al., 2017; LOPERA-VASQUEZ et al., 2017). Entretanto, até o momento

o efeito da suplementação de VE do oviduto durante a etapa de fertilização *in vitro* não foi investigado.

No presente estudo, VEs pequenas foram obtidas do lavado de oviduto bovino em dois momentos do ciclo estral, pós-ovulatório e em meio de ciclo estral, de acordo com a aparência do corpo lúteo, segundo Ireland, Murphee e Coulson (1980). Apesar do oviduto em momento pós-ovulatório estar de acordo com o momento fisiológico da fertilização, foi considerado o uso de ovidutos em diferentes momentos para avaliar se a origem de VEs pequenas influenciada pelo ambiente endócrino pode afetar a fertilização *in vitro*. Como suporte, um estudo recente demonstrou que há efeito do momento do ciclo estral no conteúdo de VEs de oviduto bovino, indicando uma maior diferença entre VEs do estágio pós-ovulatório em comparação aos demais estágios (ALMIÑANA et al., 2018).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o *pellet* do isolamento obtido do lavado do oviduto possuía VEs em formato de taça e tamanho adequado (<150nm) baseado em imagens de microscopia eletrônica de transmissão. O *pellet* obtido também estava enriquecido em proteína específica ALIX e não possuía CYTOCROMO C, uma proteína de origem mitocondrial, presente somente no lisado de células. A média de tamanho e concentração das VEs obtidas em lavado foram 137,75 ± 10,06 nm e $8{,}80 \times 10^{10}$ ± $2{,}14 \times 10^{10}$ partículas/mL, respectivamente. O tamanho e a concentração de VEs em lavados de diferentes momentos do ciclo estral foram avaliados por Almiñana et al. (2018), demonstrando que não há diferenças nestes padrões de VEs quando os diferentes momentos do ciclo estral foram comparados (ALMIÑANA et al., 2018). A partir destes resultados demonstramos que o isolamento das VEs foi eficiente e de acordo com as recomendações da "*International Society for Extracelular Vesicles*" descritas no "*Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018)*" (THÉRY et al., 2018).

Os resultados após suplementação de VEs de diferentes estágios do ciclo estral durante a fertilização *in vitro* indicaram que não há diferença em taxas de produção quando avaliadas taxas de fertilização, clivagem e blastocistos. Os estudos utilizando VEs como suplementação investigaram seu efeito somente durante o cultivo *in vitro.* Estes estudos demonstraram que VEs oriundas de células de oviduto no cultivo *in vitro* não afetam taxas de produção de embriões (LOPERA-VÁSQUEZ et al.,

2016). Já a suplementação com VEs do lavado do oviduto em estágio pós-ovulatório demonstrou aumento em taxas de blastocistos no dia 7 de cultivo quando estas VEs foram previamente congeladas em comparação com VEs frescas ou embriões não suplementados com VEs (ALMIÑANA et al., 2017). As VEs frescas de oviduto apresentaram aumento nas taxas de blastocisto apenas no dia 9 de cultivo (ALMIÑANA et al., 2017). A adição de VEs de oviduto obtidas da ampola ou do istmo no cultivo de embriões também não apresentou diferenças nas taxas de produção de blastocistos entre os dias 7 e 9 (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017). Desta forma, nossos resultados são semelhantes ao que foi descrito na literatura.

Apesar de os resultados em taxas de produção utilizando VEs não congeladas não serem afetados no dia 7 de cultivo após suplementação com VEs do oviduto, foi demonstrado que os embriões produzidos apresentam maior qualidade quando avaliados números de células (ALMIÑANA et al., 2017; LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016), sobrevivência após vitrificação (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017; LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016) e transcritos importantes para o desenvolvimento embrionário (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017; LOPERA-VÁSQUEZ et al., 2016). Baseado nisso, alguns transcritos relacionados com qualidade embrionária foram selecionados para análises nos embriões produzidos *in vitro*. A expressão relativa de *HSPA4* (ZHANG et al., 2011), *CDKN1C* (DRIVER et al., 2013), *CTNNBL1* (MAMO et al., 2011), *OCT4* (NICHOLS et al., 1998) *e BCL2* (BORUSZEWSKA et al., 2015), relacionados com embriões viáveis, e *DNAJC15* (ZHANG et al., 2011), *BAX* (MELKA et al., 2010) e *BMP4* (LI et al., 2012), relacionados com embriões inviáveis, foi avaliada. Os resultados demonstraram que não há diferença na abundância dos transcritos avaliados nos embriões. Apesar da ausência de diferença transcricional, sugerimos que possa ocorrer modificações pós-transcricionais para controle da tradução nos embriões dos diferentes grupos avaliados, como sugerido por Meirelles e colaboradores (MEIRELLES et al., 2004).

O uso do fluido de todo o oviduto (ampola e istmo) pode ser uma das justificativas para estes resultados, visto que as VEs originadas do istmo tem efeito benéfico na qualidade de embriões produzidos *in vitro* em comparação à ampola (LOPERA-VASQUEZ et al., 2017). Além disso, possivelmente os ovidutos utilizados para coleta do lavado não tiveram contato com espermatozoides, o que pode modificar

seu ambiente (MAILLO et al., 2016). Como revisado por Almiñana e Bauersachs (2019), os estudos envolvendo as funções de VEs do oviduto e suas moléculas ainda são escassos e precisam ser mais explorados, já que as VEs parecem ter potencial de serem utilizadas no sistema *in vitro* de embriões como ferramenta para mimetizar mecanismos de sinalização que ocorrem no ambiente *in vivo.* Recentemente, foi descrito que o uso de VEs de oviduto de doadoras em receptoras no momento da transferência embrionária aumentou as taxas de nascimento em camundongos (QU et al., 2019). Desta forma, hipotetizamos que a partir de mais estudos será possível avaliar a funcionalidade e os efeitos das VEs do oviduto e adequar seu uso na etapa de fertilização e também no cultivo de embriões *in vitro,* o que pode garantir melhores resultados e aplicabilidade destas VEs.

7 CONCLUSÕES

7.1 Estudo 1: Caracterização de vesículas extracelulares pequenas oriundas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral bovino.

Este estudo demonstra que folículos pequenos obtidos de estágios distintos do ciclo estral podem ser associados a diferentes concentrações de P4 no FF. As VEs pequenas isoladas de folículos expostos à baixa ou alta concentração de P4 possuem diferentes perfis de miRNAs maduros e precursores. O conteúdo de miRNAs precursores é aumentado em VEs pequenas do FF exposto à baixa P4 em relação à alta P4. Estes miRNAs modulam importantes vias relacionadas ao desenvolvimento do folículo ovariano e à maturação oocitária. Portanto, demonstramos que as diferentes origens foliculares influenciadas pelo ambiente endócrino modificam o conteúdo de miRNAs de VEs pequenas, sugerindo a modulação de vias biológicas de forma distinta em células receptoras.

7.2 Estudo 2: O uso de vesículas extracelulares pequenas como suplementação na maturação in vitro de complexos cumulus-oócitos bovinos.

A partir deste estudo foi possível demonstrar de forma temporal a internalização de VEs pequenas do FF por CCOs bovinos durante a maturação *in vitro* sugerindo que, além de ser englobada por células do cumulus, as VEs pequenas podem ter função de entrega seletiva de moléculas que atingem o citoplasma oocitário. Porém, no sistema de produção *in vitro* utilizado, não foi possível detectar efeito da adição de VEs pequenas obtidas de folículos expostos à baixa e à alta concentração e P4 nas taxas de produção de embriões *in vitro.*

7.3 Estudo 3: O impacto da suplementação de vesículas extracelulares pequenas no transporte de RNA em complexos cumulus-oócitos bovinos durante a maturação in vitro.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que moléculas de RNA em VEs pequenas do FF são transferidas para células do cumulus. De forma importante, detectamos que há transporte de RNA desde as células do cumulus em direção ao oócito. O estudo demonstrou que há aumento do trânsito de RNA na região da zona pelúcida dos CCOs maturados *in vitro* em comparação aos CCOs imaturos. Entretanto, não detectamos o aumento na quantidade do RNA transportado quando os CCOs foram suplementados com VEs pequenas. Adicionalmente, não foi detectado aumento da quantidade de RNA nos oócitos maduros suplementados com VEs dos grupos baixa e alta concentração de P4. Portanto, este estudo sugere que as VEs são importantes carreadoras de RNA para o CCO bovino durante a maturação *in vitro*, que há moléculas de RNA na região da zona pelúcida do oócito, mas que não detectamos aumento da quantidade de RNA nos oócitos após suplementação com VEs. Sendo assim sugerimos análises mais refinadas, como o uso de oligos marcados, para demonstrar a entrega e transporte de RNA nos COCs após a suplementação com VEs.

7.4 Estudo 4: Modificações transcricionais em células do cumulus de oócitos bovinos causadas pela suplementação de vesículas extracelulares pequenas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral.

Em conjunto, os dados deste estudo demonstram que as VEs pequenas obtidas de fluido de folículos em momentos distintos do ciclo estral, associados à baixa e à alta concentração de P4, causam alterações moleculares em células do cumulus. As vias de sinalização PI3K-Akt e de transporte de RNA foram exploradas inicialmente e foi demonstrado que a abundância de transcritos dessas vias, *PTEN* e *EIF4E,* é modificada a partir da suplementação de VEs em 9 e 24 horas de maturação *in vitro*,

respectivamente. A análise da proteína PTEN não apresentou diferença em células do cumulus após 9 horas de maturação *in vitro*, sugerindo a regulação mediada por miRNAs. Porém, quando analisados os perfis de miRNAs e RNAs nestas células foi demonstrado que as VEs pequenas de diferentes origens foliculares causam modificações do conteúdo das células receptoras logo no início da maturação, o que gerou modificações em processos biológicos e funções moleculares moduladas. De modo geral, a suplementação com VEs independente do estágio do ciclo estral parece ativar a via de sinalização PI3K-Akt a partir das análises do resultado de sequenciamento. As células suplementadas com VEs do grupo baixa P4 parecem modular mais ativamente vias de processos relacionados à ovulação e à resposta imune, enquanto as VEs do grupo alta P4 parecem estar mais envolvidas com respostas de transcrição e tradução.

Portanto, este estudo demonstra que as VEs pequenas obtidas de folículos em diferentes momentos do ciclo estral, expostos à baixa e à alta concentração de P4, causam diferentes efeitos em células do cumulus desde as 9 horas de maturação *in vitro*. A partir deste estudo sugerimos que ambas VEs pequenas de diferentes momentos do ciclo estral podem ser benéficas aos CCOs, entretanto, podem ser aplicadas em momentos diferentes da maturação *in vitro*. Possivelmente, as VEs expostas a baixas concentrações de P4 poderiam ser suplementadas em momentos inicias de maturação, enquanto as VEs expostas a altas concentrações de P4 poderiam ser utilizadas no momento final da maturação. Esta consideração está de acordo com a fato de que durante o período próximo da ovulação ocorrem modificações no conteúdo hormonal de folículos, relacionadas ao aumento de P4 (DIELEMAN et al., 1983). É importante considerar que os CCOs utilizados para maturação *in vitro* são heterogêneos, visto que são coletados de folículos em diferentes condições fisiológicas, por isso mais estudos devem ser realizados para melhor compreender as moléculas necessárias para cada CCO e em cada momento da maturação *in vitro*, as quais podem ser transportadas e entregues para os CCOs por meio de VEs.

7.5 Estudo 5: Caracterização e uso de vesículas extracelulares pequenas do oviduto bovino na suplementação de complexos cumulus-oócitos e espermatozoides durante a fertilização in vitro.

Este estudo demonstrou que as VEs obtidas do lavado do oviduto bovino estão de acordo com a caracterização esperada. A suplementação durante a fertilização *in vitro* de VEs pequenas do oviduto bovino obtidas de diferentes momentos do ciclo estral mostrou que não geram diferenças em taxas de produção e em transcritos relacionados à qualidade embrionária. Portanto, mais estudos necessitam ser realizados para avaliar a comunicação de VEs pequenas do oviduto com CCOs e espermatozoides e os possíveis mecanismos de ação e efeitos desta comunicação.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente estudo testou a hipótese geral de que a origem de VEs pequenas do FF e de oviduto impactam seu conteúdo e modulam de forma distinta os CCOs e embriões bovinos, respectivamente. Para isso foi considerada a importância de VEs pequenas do FF e do oviduto bovino na participação dos mecanismos de comunicação intercelular. Foi considerado que o ambiente folicular e do oviduto são afetados de acordo com os momentos do ciclo estral, acompanhados por alterações nos padrões hormonais. A partir deste estudo foi possível verificar pela primeira vez que o fluido de folículos ovarianos pequenos de diferentes momentos do ciclo estral possui VEs pequenas com diferentes perfis de miRNAs. As VEs pequenas foram utilizadas como forma de suplementação durante a maturação *in vitro*, o que demonstrou sua dinâmica de internalização por CCOs e a entrega de moléculas de RNA. Em suma, a suplementação com VEs pequenas de diferentes origens foliculares impactou de forma distinta as células do cumulus, o que tem grande potencial de modificar moléculas enviadas para o citoplasma oocitário. A partir deste estudo verificamos que as VEs pequenas de diferentes folículos podem ser benéficas aos CCOs e utilizadas como ferramenta de suplementação durante a etapa de maturação *in vitro*. O lavado do oviduto bovino também é uma importante fonte de VEs pequenas e, apesar de não detectarmos efeitos de sua suplementação neste estudo, estas VEs pequenas têm grande potencial de serem utilizadas como ferramenta na suplementação nas etapas de fertilização e cultivo *in vitro*.

Finalmente, a partir do grande número de informações geradas por este estudo será possível utilizar o modelo de diferentes origens de VEs pequenas de acordo com o ambiente endócrino para esclarecimento dos seus efeitos em gametas e embriões e então aplicá-las ao sistema de produção *in vitro* de diferentes espécies como ferramenta para mimetizar o ambiente *in vivo*. Isto indica que, assim como a importância da origem dos CCOs, a origem de VEs pequenas obtidas de fluidos pode ser utilizada como nova estratégia para aprimorar o sistema de reprodução assistida em animais e humanos.

REFERÊNCIAS

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. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, n. 1, p. 57–66, 2002.

ADAMS, G. P. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 1, p. 72–80, 2008.

ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 382, n. 1, p. 480–487, 2014.

AL-DOSSARY, A. A.; STREHLER, E. E.; MARTIN-DELEON, P. A. Expression and secretion of plasma membrane Ca 2 + - ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus : association with oviductal exosomes and uptake in sperm. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1–14, 2013.

ALBERTINI, D. F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 5, p. 647–653, 2001.

ALBERTINI, D. F.; RIDER, V. Patterns of intercellular connectivity in the mammalian cumulus-oocyte complex. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 27, n. 2, p. 125–133, 1994.

ALESSI, D. R. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. **Current Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 261–269, 1997.

ALI, A. et al. Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, n. 9, p. 1596–1606, 2004.

ALMIÑANA, C. et al. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. **Reproduction**, Cambridge, v. 154, n. 3, p. 253–268, 2017.

ALMIÑANA, C. et al. Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle : implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. **BMC Genomics**, London, v. 19, n. 622, p. 1–27, 2018.

ALMIÑANA, C.; BAUERSACHS, S. Extracellular Vesicles in the Oviduct : Progress , Challenges and Implications for the Reproductive Success. **Bioengineering**, v. 6, n. 32, p. 1–25, 2019.

ANDRADE, G. et al. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 52, n. 6, p. 1–10, 2017a.

ANDRADE, G. M. et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. 1–15, 2017b.

APARICIO, I. M. et al. Expression , regulation , and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 84, n. 5, p. 910–921, 2011.

ARSLAN, F. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem Cell Research**,

Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 301–312, 2013.

ARTINI, P. G. et al. Cumulus cells surrounding oocytes with high developmental competence exhibit down-regulation of phosphoinositol 1, 3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling genes involved in proliferation and survival. **Human Reproduction**, Oxford, v. 32, n. 12, p. 2474–2484, 2017.

ASSOU, S. et al. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. **Human Reproduction**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 3038–3049, 2013.

AVILÉS, M.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; COY, P. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 896–906, 2010.

BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves : a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 1903–1921, 1998.

BARKALINA, N. et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of molecular compounds into gametes and embryos: learning from nature. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 627–639, 2015.

BARTEL, D. P. Metazoan microRNAs. **Cell**, Cambridge, v. 173, n. 1, p. 20–51, 2018.

BARUSELLI, P. S. et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, suppl. 4, p. 134–141, 2012.

BENDER, K. et al. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 6, p. 1047–1055, 2010.

BIAN, S. et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 92, n. 4, p. 387–397, 2014.

BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 93, n. 8, p. 3578–3587, 2010.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BONI, R. et al. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, n. 4, p. 1050–1055, 1999.

BORUSZEWSKA, D. et al. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 13, n. 44, p. 1–18, 2015.

BOUILLON, C. et al. Does embryo culture medium influence the health and development of children born after in vitro fertilization? **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.

BRIEN, Y. O.; WINGFIELD, M.; SHEA, L. C. O. Anti-Müllerian hormone and progesterone levels in human follicular fluid are predictors of embryonic development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2019.

BRISTOW, J. et al. Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 122, n. 1, p. 265–278, 1993.

BRUNET, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. **Cell**, Cambridge, v. 96, n. 6, p. 857–868, 1999.

BURNS, G. W. et al. Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 98, n. 5, p. 612–622, 2018.

CAIXETA, E. S. et al. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. **Reproduction**, Cambridge, v. 146, n. 1, p. 27–35, 2013.

CARLETTI, M. Z.; FIEDLER, S. D.; CHRISTENSON, L. K. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 286–295, 2010.

CECCONI, S. et al. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. **International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 56, n. 10–12, p. 809–817, 2012.

CHENG, Y. et al. Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 29, n. 6, p. 2423–2430, 2015.

CLARK, L. J. Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 4, p. 1071–1078, 2004.

CLARKE, H. J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. **WIREs Developmental Biology**, Malden, v. 7, n. 1, p. 1–22, 2017.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009.

COLLINO, F. et al. AKI recovery induced by mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles carrying microRNAs. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 26, n. 10, p. 2349–2360, 2015.

CONTI, M. et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation Marco. **Molecular Cell Endocrinology**, Limerick, v. 356, n. 1–2, p. 65–73, 2012.

CUELLAR, T. L.; MCMANUS, M. T. MicroRNAs and endocrine biology. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 187, n. 3, p. 327–332, 2005.

CUNNINGHAM, M. A.; ZHU, Q.; HAMMOND, J. M. FoxO1a can alter cell cycle progression by regulating the nuclear localization of $p27^{kip}$ in granulosa cells. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 18, n. 7, p. 1756–1767, 2004.

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. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 86, n. 3:71, p. 1–10, 2012.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Regulation of ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 12, n. 44, p. 1–9, 2014.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 22, n. 12, p. 1–

10, 2015a.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor-β signalling during follicle development in the mare. **Reproduction, Fertility, and Development**, East Melbourne, v. 27, n. 6, p. 897–905, 2015b.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. 1–25, 2017.

DE ÁVILA, A. C. F. C. M. et al. Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 16, n. 1, p. 31–38, 2019.

DE BEM, T. H. C. et al. Low levels of exosomal-miRNAs in maternal blood are associated with early pregnancy loss in cloned cattle. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 14319, 2017.

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**, East Melbourne, v. 28, n. 11, p. 1721–1732, 2016.

DEL COLLADO, M. et al. In vitro maturation impacts cumulus oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, Cambridge, v. 154, n. 6, p. 881–893, 2017a.

DEL COLLADO, M. et al. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during in vitro maturation of bovine oocytes. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1:2645, p. 1–13, 2017b.

DENICOL, A. C. et al. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 95, n. 4, p. 1794–1806, 2012.

DIELEMAN, S. J. et al. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. **Jounal of Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 31–42, 1983.

DIEZ-FRAILE, A. et al. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization. **Human Fertility,** Cambridge, v. 17, n. 2, p. 90–8, 2014.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

DONG, L. Q. et al. Phosphorylation of protein kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 97, n. 10, p. 5089–5094, 2000.

DRIVER, A. M. et al. Knockdown of CDKN1C (p57kip2) and PHLDA2 results in developmental changes in bovine pre-implantation embryos. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2013.

DUNNING, K. R. et al. Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 2842–2850, 2007.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 30, n. 6, p. 624–712, 2009.

EWELS, P.; LUNDIN, S.; MAX, K. MultiQC : summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, Oxford, v. 32, n. 19, p. 3047–3048, 2016.

EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. **Reproduction**, Cambridge, v. 85, n. 2, p. 715–720, 1989.

FAZI, F.; NERVI, C. MicroRNA : basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 553–561, 2008.

FIEDLER, S. D. et al. Hormonal regulation of microRNA expression in periovulatory mouse mural. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 76, n. 6, p. 1030–1037, 2008.

FORTUNE, J. E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production1. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 35, n. 2, p. 292–299, 1986.

FORTUNE, J. E.; HILBERT, J. L. Estradiol secretion by granulosa cells from rats with four- or five-day estrous cycles : the development of responses to follicle-stimulating hormone versus luteinizing hormone. **Endocrinology**, New York, v. 118, n. 6, p. 2395–2401, 1986.

FORTUNE, J. E.; YANG, M. Y.; MURUVI, W. The earliest stages of follicular development: follicle formation and activation. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, Packington, v. 67, p. 203–216, 2010.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. **Biochemical Journal**, London, v. 359, n. 1, p. 1–16, 2001.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

GARCÍA-MANRIQUE, P. et al. Therapeutic biomaterials based on extracellular vesicles: classification of bio-engineering and mimetic preparation routes. **Journal of Extracellular Vesicles**, Jarfalla, v. 7, n. 1, p. 1–18, 2018.

GARCIA, J.; AVELINO, K.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo, 2004. p. 223–230.

GASPERIN, B. G. et al. Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling pathways in granulosa cells during bovine follicular deviation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 83, n. 3, p. 353–359, 2015.

GE, H. et al. Impaired mitochondrial function in murine oocytes is associated with controlled ovarian hyperstimulation and in vitro maturation. **Reproduction, Fertility, and Development**, East Melbourne, v. 24, n. 7, p. 945–52, 2012.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 159–177, 2008.

GIMENES, L. U. et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect invitro embryo production in Bos indicus, Bos taurus, and Bubalus bubalis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 83, n. 3, p. 385–393, 2015.

GOSDEN, R. G. et al. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 82, n. 2, p. 813–825, 1988.

GRAF, A. et al. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 111, n. 11, p. 4139–4144, 2014a.

GRAF, A. et al. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 149, n. 1–2, p. 46–58, 2014b.

GRAY, N. K.; GORGONI, B. The roles of cytoplasmic poly (A) -binding proteins in regulating gene expression : a developmental perspective. **Briefings in functional genomics and proteomics**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 125–141, 2004.

GRIMES, R.; IRELAND, J. J. Relationship of macroscopic concentrations appearance of steroids of the surface in follicular of bovine ovarian follicles , and maturation of oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 35, n. 3, p. 725–732, 1986.

GRIMES, R.; MATTON, P.; IRELAND, J. J. A comparison of histological and non-histological indices of atresia and follicular function. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 37, n. 1, p. 82–88, 1987.

GUO, M. et al. P4 down-regulates Jagged2 and Notch1 expression during primordial folliculogenesis Meng. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, Tampa, v. 4, p. 2631–2644, 2012.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 68, n. 4, p. 441–448, 2004.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667–2688, 2011.

HAGEMANN, L. J. et al. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, n. 4, p. 451–458, 1999.

HAHN, K. L. et al. Lunatic fringe null female mice are infertile due to defects in meiotic maturation. **Development**, Cambridge, v. 132, n. 4, p. 817–828, 2005.

HANSEL, W.; ECHTERNKAMP, S. E. Control of ovarian function in domestic animals. **American Zoologist**, McLean, v. 12, n. 2, p. 225–243, 1972.

HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 5, p. 909–920, 2004.

HERNANDEZ-GONZALEZ, I. et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes : does this expand their role in the ovulation process? **Molecular Endocrinology,** Baltimore, v. 20, n. 6, p. 1300–1321, 2006.

HILLIER, S. G.; ZELEZNIK, A. J.; ROSS, G. T. Independence of steroidogenic capacity and luteinizing hormone receptor induction in developing granulosa cells. **Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 937–946, 1978.

HONG, X. et al. Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. **Endocrinology**, New York, v. 149, n. 12, p. 6207–6212, 2008.

HOSSAIN, M. M. et al. Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 349, n. 3, p. 679–690, 2012.

HUNG, W.-T. et al. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 93, n. 5, p. 1–9, 2015.

HUNG, W. et al. Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 97, p. 644–655, 2017.

HUSSEIN, T. S. et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 118, n. 22, p. 5257–5268, 2005.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 1, p. 23–32, 1997.

HYTTEL, P. Gametogenesis. In: HYTTEL, P; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essential of domestic animal embryology.** Amsterdam: Elsevier, 2010. cap. 4, p. 32-55.

IRELAND, J. J.; COULSON, P. B.; MURPHREE, R. L. Follicular development during four stages of the estrous cycle of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, n. 5, p. 1261–1269, 1979.

IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L.; COULSON, P. B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 1, p. 155–60, 1980.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotr opins. **Endocrinology**, New York, v. 112, n. 1, p. 150–156, 1983.

JO, M.; KOMAR, C. M.; FORTUNE, J. E. Gonadotropin surge induces two separate increases in messenger RNA for progesterone receptor in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 6, p. 1981–1988, 2002.

JONG, O. G. et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell- derived exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, Jarfalla, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2012.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 4, p. 847–856, 2000.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 376–385, 2005.

KISSIN, D. M.; JAMIESON, D. J.; BARFIELD, W. D. Monitoring health outcomes of assisted reproductive technology. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 371, n. 1, p. 91–3, 2014.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 191–206, 2006.

KOH, Y. Q. et al. Proteome profiling of exosomes derived from plasma of heifers with divergent genetic merit for fertility. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 101, n. 7, p. 6462–6473, 2018.

KORDELAS, L. et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-

versus-host disease. **Leukemia**, London, v. 28, n. 4, p. 935–979, 2014.

KROPP, J.; SALIH, S. M.; KHATIB, H. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 5: 91, p. 1–8, 2014.

KURUIP, T.; DIELEMAN, S. Steroid hormone concentration in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 24, n. 4, p. 395–408, 1985.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. **Science**, New York, v. 294, n. 5543, p. 853–858, 2001.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Oviductal microvesicles and their effect on in vitro maturation of canine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 154, n. 2, p. 167–180, 2017.

LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. **Science**, New York, v. 294, n. 5543, p. 858–862, 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LEE, Y. et al. MicroRNA maturation: stepwisee processing and subcellular localization. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 21, n. 17, p. 4663–4670, 2002.

LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, London, v. 425, n. 6956, p. 415–419, 2003.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The Embo Journal**, Heidelberg, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.

LEESE, H. J. et al. Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2008.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 48, n. 1, p. 76–86, 1979.

LEROY, J. L. M. R. et al. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, n. 6, p. 1131–1143, 2004.

LI, G. et al. Genes of the transforming growth factor-beta signalling pathway are associated with pre-implantation embryonic development in cattle. **Journal of Dairy Research,** Cambridge, v. 79, n. 3, p. 310–317, 2012.

LI, J. et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 107, n. 22, p. 10280–10284, 2010.

LINDOSO, R. S. et al. Extracellular vesicles released from mesenchymal stromal cells modulate miRNA in renal tubular cells and inhibit ATP depletion injury. **Stem Cells and Development**, Larchmont, v. 23, n. 15, p. 1809–1819, 2014.

LIU, S. et al. MSC transplantation improves osteopenia via epigenetic regulation of notch signaling in lupus. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 606–618, 2015.

LOPERA-VASQUEZ, R. et al. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo

development and quality in vitro. **Reproduction**, Cambridge, v. 153, n. 4, p. 461–470, 2017.

LOPERA-VÁSQUEZ, R. et al. Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 1–23, 2016.

LÖTVALL, J. O. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, Jarfalla, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2014.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, London, v. 15, n. 550, p. 1–21, 2014.

LUCIANO, A. M. et al. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1252–1259, 2011a.

LUCIANO, A. M. et al. Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 55, n. 3, p. 27, 2011b.

MACAULAY, A. D. et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 91, n. 4, p. 1–12, 2014.

MACAULAY, A. D. et al. Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 94, n. 16, p. 1–11, 2016.

MACHATKOVA, M. et al. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 4, p. 801–810, 1996.

MACHTINGER, R. et al. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Dordrecht, v. 34, n. 4, p. 525–533, 2017.

MAGDALENA, W. et al. Delayed-type hypersensitivity underlying casein allergy is suppressed by extracellular vesicles carrying miRNA-150. **Nutrients**, Basel, v. 11, n. 907, p. 1–18, 2019.

MAILLO, V. et al. Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. **Reproduction**, Cambridge, v. 152, n. 4, p. 127–141, 2016.

MAMO, S. et al. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptuses associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1143–1151, 2011.

MAO, L. et al. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 284–299, 2014.

MARTINEZ, R. M. et al. Extracellular microRNAs profile in human follicular fluid and IVF outcomes. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

MARTINEZ, R. M. et al. Body mass index in relation to extracellular vesicle–linked microRNAs in human follicular fluid. **Fertility and Sterility**, Birmingham, p. 1–9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.001>. (In press, corrected proof).

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 10, p. 1907–1920, 2010.

MATOBA, S. et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 26, n. 2, p. 337–345, 2014.

MATSUDA, F. et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 44–50, 2012.

MCBRIDE, D. et al. Identification of miRNAs associated with the follicular–luteal transition in the ruminant ovary. **Reproduction**, Cambridge, v. 144, n. 2, p. 221–233, 2012.

MEIRELLES, F. V et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82–83, p. 13–20, 2004.

MELKA, M. et al. Expression of apoptosis regulatory genes and incidence of apoptosis in different morphological quality groups of in vitro -produced bovine pre-implantation embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 5, p. 915–921, 2010.

MELLISHO, E. A. et al. Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. 1–15, 2017.

MOLYNEAUX, K. A. et al. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. **Developmental Biology**, San Diego, v. 240, n. 2, p. 488–498, 2001.

MORALES DALANEZI, F. et al. Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 205, p. 94–104, 2019.

NASSER, L. F. et al. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (Bos indicus) donors. **Theriogenology**, Stoneham, v. 76, n. 2, p. 320–327, 2011.

NAVAKANITWORAKUL, R. et al. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. April, p. 1–14, 2016.

NG, Y. H. et al. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 1–13, 2013.

NGUYEN, J.; SZOKA, F. C. Nucleic acid delivery : the missing pieces of the puzzle? **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 45, n. 7, p. 1153–1162, 2012.

NICHOLS, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, Cambridge, v. 95, n. 3, p. 379–391, 1998.

NISHIMOTO, H. et al. Classification of bovine follicles based on the concentrations of steroids , glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 220–224, 2009.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 3, p. 333–339, 2002.

O'GORMAN, A. et al. Metabolic profiling of human follicular fluid identifies potential biomarkers of oocyte developmental competence. **Reproduction**, Cambridge, v. 146, n. 4, p. 389–395, 2013.

O'SHEA, L. C. et al. Developmental competence in oocytes and cumulus cells : candidate genes and networks. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, New York, v. 58, n. 2, p. 88–101, 2012.

O'SHEA, L. C. et al. ATRX is a novel progesterone regulated protein and biomarker of low developmental potential in mammalian oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 153, n. 5, p. 671–682, 2017.

ORSI, N. M. et al. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. **Reproduction**, Cambridge, v. 129, n. 2, p. 219–228, 2005.

ORSI, N. M.; REISCHL, J. B. Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 3, p. 441–458, 2007.

PAN, B. T. et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 101, n. 3, p. 942–948, 1985.

PAVANI, K. C. et al. Emerging role of extracellular vesicles in communication of preimplantation embryos in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 29, n. 1, p. 66–83, 2017.

PELUSO, J. J. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 75, n. 1, p. 2–8, 2006.

QU, J. L. et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. **Digestive and Liver Disease**, v. 41, n. 12, p. 875–880, 2009.

QU, P. et al. Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth rates after embryo transfer in mice. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 31, n. 3, p. 324–332, 2019.

RABINOWITS, G. et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. **Clinical Lung Cancer**, Dallas, v. 10, n. 1, p. 42–46, 2009.

RAPOSO, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of Experimental Medicine**, Baltimore, v. 183, n. 3, p. 1161–1172, 1996.

READER, K.; STANTON, J.; JUENGEL, J. The role of oocyte organelles in determining developmental competence. **Biology**, Basel, v. 6, n. 3, p. 1–22, 2017.

RHOADES, M. W. et al. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 4, p. 513–520, 2002.

RICHARDS, J. S.; LIU, Z.; SHIMADA, M. Immune-like mechanisms in ovulation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 19, n. 6, p. 191–196, 2008.

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. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, n. 2, p. 234–248, 2002a.

RIZOS, D. et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 3, p. 589–595, 2002b.

RIZOS, D. et al. The consequences of maternal-embryonic cross talk during the periconception period on subsequent embryonic development. **Advances in Experimental Medice and**

Biology, New York, v. 1014, p. 69–86, 2017.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid1. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1021–1029, 2010.

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

RYAN, K. E. et al. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2008.

SAADELDIN, I. M.; OH, H. J.; LEE, B. C. Embryonic – maternal cross-talk via exosomes : potential implications. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, Auckland, v. 8, p. 103–107, 2015.

SAEED-ZIDANE, M. et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. 1–24, 2017.

SALAMONE, D. F.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 4, p. 549–561, 1999.

SANFINS, A. et al. Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in vitro and in vivo maturation of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, n. 6, p. 2059–2067, 2003.

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. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 98, n. 7, p. 3068–3079, 2013.

SANTONOCITO, M. et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid : bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 102, n. 6, p. 1751-1761.e1, 2014.

SANTOS, G. et al. Subclinical mastitis interferes with ovulation, oocyte and granulosa cell quality in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 119, n. Oct 1, p. 214–219, 2018.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, 2011.

SATITMANWIWAT, S. et al. Proteome profiling of bovine follicular fluid-specific proteins and their effect on in vitro embryo development. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 79, n. 5, p. 842–847, 2017.

SCARAMUZZI, R. J. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 23, n. 3, p. 444–467, 2011.

SCHAUER, S. N. et al. Involvement of miRNAs in equine follicle development. **Reproduction**, Cambridge, v. 146, n. 3, p. 273–282, 2013.

SERTA, R. T. et al. The developmental potential of mouse oocytes matured in serum-free culture

conditions. **Human Reproduction**, v. 10, n. 7, p. 1810–1815, 1995.

SHAO, R. et al. Expression of progesterone receptor (PR) A and B isoforms in mouse granulosa cells: stage-dependent PR-mediated regulation of apoptosis and cell proliferation1. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 3, p. 914–921, 2003.

SILVA, C.; KNIGHT, P. G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 119, n. 2, p. 261–269, 2000.

SIMPSON, R. J.; JENSEN, S. S.; LIM, J. W. E. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, n. 19, p. 4083–4099, 2008.

SINCLAIR, K. D. et al. Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals. **Reproduction, Fertility and Development,** East Melbourne, v. 28, n. 10, p. 1443-1478, 2016.

SINDEREWICZ, E. et al. Lysophosphatidic acid expression in theca cells depends on the type of bovine ovarian follicle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 52, n. 1, p. 28–34, 2017.

SIRARD, M. A. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: the effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, n. 1, p. 54–61, 2016.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.

SIRARD, M. A. et al. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, n. 1, p. 85–94, 1995.

SIRARD, M. A. et al. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 4, p. 699–708, 1999.

SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, London, v. 10, n. 12, p. 1470–1476, 2008.

SOHEL, M. M. H. et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1–18, 2013.

STOJKOVIC, M. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001.

STREMERSCH, S.; SMEDT, S. C.; RAEMDONCK, K. Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 244, Pt B, p. 167–183, 2016.

SU, N. et al. Combinatorial regulation of transcription factors and microRNAs. **BMC Systems Biology**, London, v. 4, n. 1, p. 150, 2010.

SUBRA, C. et al. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. **Biochimie**, Paris, v. 89, n. 2, p. 205–212, 2007.

SUN, L. et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

TANNETTA, D. et al. Extracellular vesicles and reproduction – promotion of successful pregnancy. **Cellular and Molecular Immunology**, Beijing, v. 11, n. 6, p. 548–563, 2014.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 13–21, 2008.

TESFAYE, D. et al. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 39, n. 6, p. 396–404, 2004.

TESFAYE, D. et al. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus – oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 21, n. 3, p. 451–461, 2009a.

TESFAYE, D. et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 76, n. 7, p. 665–677, 2009b.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, Jarfalla, v. 7, n. 1, p. 1–43, 2018.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 2, n. 8, p. 569–579, 2002.

THOMPSON, J. G.; PETERSON, A. J. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, suppl. 5, p. 59–67, 2000.

TOWNSON, D. H.; COMBELLES, C. M. H. Ovarian follicular atresia. In: DARWISH, A. (Ed.) **Basic Gynecology - Some Related Issues.** London: IntechOpen, 2012. cap. 2, p. 43–76.

TSAFRIRI, A. et al. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Developmental Biology**, San Diegov. 178, n. 2, p. 393–402, 1996.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, Philadelphia, v. 9, n. 6, p. 803–815, 2014.

URSELY, J.; LEYMARIE, P. Varying response to luteinizing hormone of two lutel cell types isolated from bovine corpus luteum. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 83, n. 3, p. 303–310, 1978.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, London, v. 9, n. 6, p. 654–9, 2007.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 47, n. 1, p. 47–56, 1997.

VANORNY, D. A.; MAYO, K. E. The role of Notch signaling in the mammalian ovary.

Reproduction, Cambridge, v. 153, n. 6, p. 1–32, 2017.

VASSENA, R. et al. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 5, p. 923–932, 2003.

VIGONE, G. et al. Transcriptome based identification of mouse cumulus cell markers that predict the developmental competence of their enclosed antral oocytes. **BMC Developmental Biology**, London, v. 14:330, p. 1–7, 2013.

WANG, P. et al. Differential expression of microRNAs in 2-cell and 4-cell mouse embryos. **Zygote**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 455–461, 2013.

WATSON, A. J. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 2, p. 355–64, 2000.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 13 suppl, p. 2004–2006, 2007.

WITWER, K. W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**, Jarfalla, v. 2, n. 1, p. 1–25, 2013.

XIAO, G. Y. et al. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.

XU, B. et al. Characterization of microRNA profile in human cumulus granulosa cells: identification of microRNAs that regulate Notch signaling and are associated with PCOS. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 404, p. 26–36, 2015.

XU, T. et al. Differentially expressed micoRNAs in human oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Dordrecht, v. 28, n. 6, p. 559–566, 2011.

XU, Z. et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 53, n. 4, p. 951–7, 1995.

YAN, S. P. et al. LncRNA LINC01305 silencing inhibits cell epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer by inhibiting TNXB-mediated PI3K/Akt signalling pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 2656–2666, 2019.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 78, n. 2008, p. 1153–1161, 2008.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 17, n. 24, p. 3011–3016, 2003.

YOSHIOKA, Y. et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. **Nature Communications**, London, v. 5, n. April, p. 1–8, 2014.

YU, G. et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. **OMICS**, Larchmont, v. 16, n. 5, p. 284–287, 2012.

ZENG, H. T. et al. In vitro-matured rat oocytes have low mitochondrial deoxyribonucleic acid and

adenosine triphosphate contents and have abnormal mitochondrial redistribution. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 91, n. 3, p. 900–907, 2009.

ZENG, Y.; CULLEN, B. R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. **RNA**, New York, v. 9, n. 1, p. 112–23, 2003.

ZHANG, B. et al. Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 94, n. 8, p. 4174–4182, 2011.

ZHANG, B. et al. MicroRNA mediating networks in granulosa cells associated with ovarian follicular development. **BioMed Research International**, London, v. 2017, p. 1–18, 2017.

ZITVOGEL, L. et al. Erradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nature Medicine**, London, v. 4, n. 5, p. 594–600, 1998.

APÊNDICE

Apêndice A- Tabela representando as sequências de primers *forward* e *reverse* utilizados no estudo 4 para avaliação da modulação de transcritos da via PI3K-Akt e da via de transporte de RNA em células do cumulus.

Gene	***Nome do gene***	***Primer***	**Sequência 5' – 3'**	**Referência**
PABPC1	poly(A) binding protein cytoplasmic 1	*PABPC1 F*	CAAATACGCTGCGGGAGTTC	NM_174568.2
		PABPC1 R	AGAGCCGTTCACCCAACATT	
PABPN1	poly(A) binding protein nuclear 1	*PABPN1 F*	TGGCCATCCGAAAGGGTTTG	NM_174569.2
		PABPN1 R	CCTCGGTCTGTTGTGCTGAT	
PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	*PAIP1 F*	GGGCCCCAGAACAAACGAG	NM_001104971.1
		PAIP1 R	GGGTAGAATTCAGGGGCGTT	
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	*EIF4G2 F*	CGTTTCAGTGCTTCTTCGGG	NM_001099859.1
		EIF4G2 R	CTGCGGAGTTGTCATCTCGT	
NXF1	nuclear RNA export factor 1	*NXF1 F*	TGAAGTCTGAGCGGGAGTTG	NM_001075555.1
		NXF1 R	TGGCCATCCAGTCGCAATAG	
CYFIP1	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	*CYFIP1 F*	CAGCAATAGCGAGGTGGTCA	NM_001205515.1
		CYFIP1 R	CCGTTGGGTGCACAAGTTTC	
EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	*EIF4B F*	ACGACTCCAGATCTGCACCTG	NM_001035028.2
		EIF4B R	TCTTCACCGTCAATGGCGAGA	
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	*EIF4E F*	TTAATGCCTGGCTGTGACTAC	NM_174310.3
		EIF4E R	ACGATCGAGGTCACTTCGTCT	
RAN	RAN, member RAS oncogene family	*RAN F*	CGGAGACGCTTCTGGAAGTA	NM_001034705.1
		RAN R	TCCTCTGTTGGTATGGAACACA	

Continua

Gene	*Nome do gene*	*Primer*	Sequência 5' – 3'	Referência
XPO5	exportin 5	*XPO5 F*	AGGCTACATTGACTGGGTGC	XM_001790537.4
		XPO5 R	TCCAACTTGCCTTTCCTGCT	
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	*BAX F*	CCCGAGTTGATCAGGACCAT	NM_173894.1
		BAX R	CACTCCAGCCACAAAGATGG	
BCL2	BCL2, apoptosis regulator	*BCL2 F*	CTTTGTGGAGCTGTATGGC	NM_001166486.1
		BCL2 R	CCAGATAGGCACCCAGGG	
FOXO3a	forkhead box O3	*FOXO3 F*	CGAAGTGGAGCTAGACCCGG	NM_001206083.1
		FOXO3 R	CGGGGATCATGGAGTCAGCA	
PTEN	phosphatase and tensin homolog	*PTEN F*	GCCACAAAGTGCCTCGTTTACC	XM_613125.6
		PTEN R	AGAAGGCAACTCTGCCAAACAC	
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	*PIK3R1 F*	ACACAGCTGACGGGACCTTT	NM_174575.1
		PIK3R1 R	CCATATTTCCCATCTCGGTGA	
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	*YWHAZ F*	GCATCCCACAGACTATTTCC	GU817014.1
		YWHAZ R	GCAAAGACAATGACAGACCA	
PPIA	peptidylprolyl isomerase A	*PPIA F*	CATACAGGTCCTGGCATC	NM_178320.2
		PPIA R	CACGTGCTTGCCATCCAA	

Legenda: F= primer forward; R= primer reverse

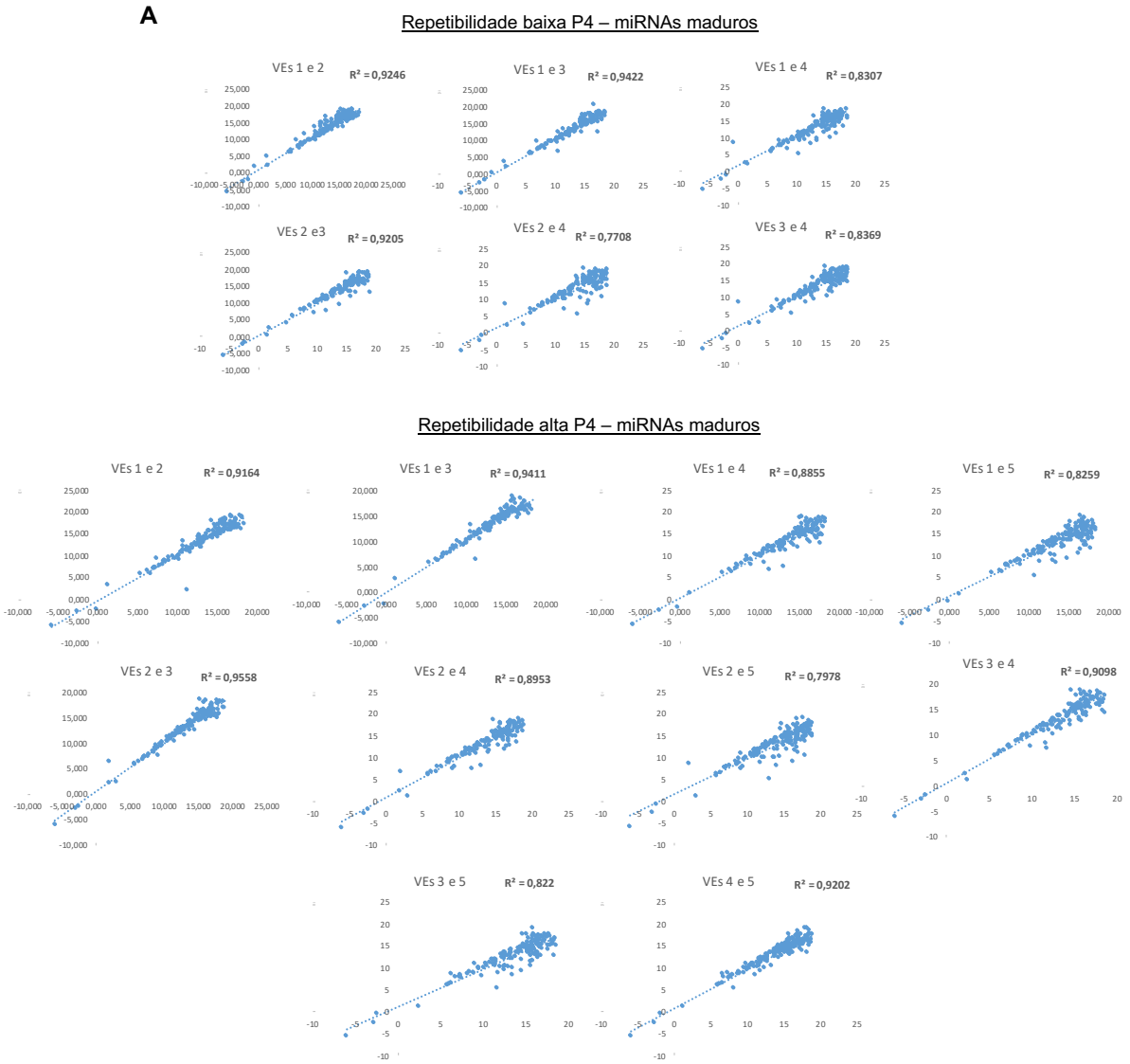
Apêndice B - Tabela representando as sequências de primers *forward* e *reverse* utilizados no estudo 5 para avaliação da modulação de transcritos relacionados à qualidade embrionária em embriões no dia 7 de cultivo *in vitro*.

Gene	***Nome do gene***	***Primer***	**Sequência 5' – 3'**	**Referência**
HSPA4	heat shock protein family A (Hsp70) member 4 (HSPA4)	*HSPA4 F*	GGAAGAGAAGATGCAAGTGGAC	NM_001114192.2
		HSPA4 R	TTGCCTTCTTGGCTTGAGGT	
CDKN1C	cyclin dependent kinase inhibitor 1C	*CDKN1C F*	CTCTCATCTCCGACTTCTTCGC	NM_001077903.2
		CDKN1C R	CTCTCCTGTCCACTGCCCAA	
CTNNBL1	catenin beta like 1	*CTNNBL1 F*	TCTGTTCGATCCTCGCTTCC	NM_174637.4
		CTNNBL1R	GACCATGTCGTGCTTTTCCC	
OCT4	POU class 5 homeobox 1	*OCT4 F*	GCAAACGATCAAGCAGTGACTAC	NM_174580.3
		OCT4 R	GGCGCCAGAGGAGAGGATACG	
DNAJC15	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C15	*DNAJC15 F*	GCTGGGTATTGCAGCTCTTG	NM_001080332.2
		DNAJC15 R	GCTGGCAGATGGGCTTACAC	
BMP4	bone morphogenetic protein 4 (BMP4)	*BMP4 F*	CGTCTGCGCCAGTCTCATTA	NM_001045877.1
		BMP4 R	GGTGTCTTGACAGAAAACAAGGC	
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	*BAX F*	CCCGAGTTGATCAGGACCAT	NM_173894.1
		BAX R	CACTCCAGCCACAAAGATGG	
BCL2	BCL2, apoptosis regulator	*BCL2 F*	CTTTGTGGAGCTGTATGGC	NM_001166486.1
		BCL2 R	CCAGATAGGCACCCAGGG	
PPIA	peptidylprolyl isomerase A	*PPIA F*	CATACAGGTCCTGGCATC	NM_178320.2
		PPIA R	CACGTGCTTGCCATCCAA	
RPL15	ribosomal protein L15	*RPL15 F*	CAAACGCCCAGTTCCTAAGG	NM_178320.2
		RPL15 R	TCGAGCAAACTTGAGCTGGT	

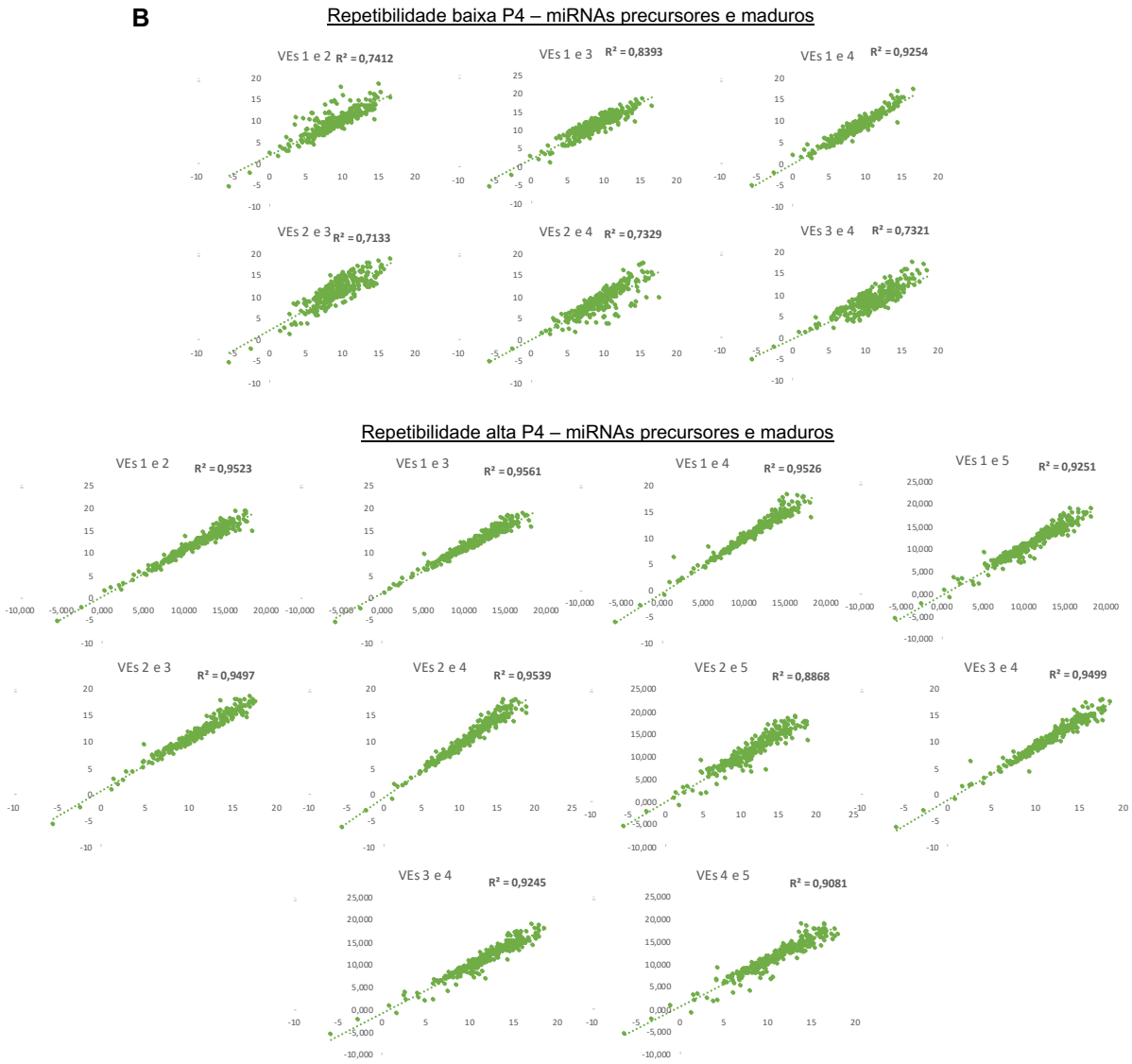
Legenda: F= primer forward; R= primer reverse

Apêndice C- Gráficos demonstrando a distribuição e a repetibilidade (R^2) do conteúdo de miRNAs entre as amostras de VEs pequenas obtidas de folículos expostos à baixa (4 *pools)* e à alta concentração (5 *pools)* de progesterona. **(A)** Representação dos miRNAs maduros e **(B)** representação dos miRNAs precursores e maduros em VEs pequenas.

A



B



Apêndice D – Tabelas demonstrando **(A)** os miRNAs maduros elevados em VEs pequenas obtidas do fluido de folículos expostos à baixa progesterona em comparação à alta progesterona e **(B)** miRNAs maduros elevados em VEs pequenas obtidas do fluido de folículos expostos à alta progesterona em comparação à baixa progesterona.

A

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-154a	UAGGUUAUCCGUGUAGCCUUCG	0,0069	95,45
bta-miR-339b	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUC	0,0279	86,95
bta-miR-1287	UGCUGGAUCAGUGGUUUGAGUC	0,0176	95,45

B

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACUAG	0,0260	90,90
bta-miR-195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGCA	0,0120	95,45
bta-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	0,0162	100,00
bta-miR-301b	CAGUGCAAUGAUAUUGUCAAAGCAU	0,0477	91,66
bta-miR-433	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	0,0393	100,00
bta-miR-670	UCCCUGAGUAUAUGUGGUGAA	0,0061	Sem similaridade

Os valores de p (p-value) são oriundos do teste de comparação entre médias dos valores de expressão relativa entre VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4. A homologia com a sequência humana indica a similaridade entre os miRNAs bovinos e humanos.

Apêndice E – Tabela demonstrando os miRNAs precursores e maduros aumentados em VEs obtidas do fluido de folículos expostos à baixa progesterona em comparação à alta progesterona.

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-664b	UAUUCAUUUAUCUCCCAGCCUAC	8,23E-06	82,60
bta-miR-543	AAACAUUCGCGGUGCACUUCUU	0,00016	100,00
bta-miR-487a	AAUCAUACAGGGACAUCCAGU	0,00017	95,45
bta-miR-488	UUGAAAGGCUGUUUCUUGGUC	0,000193	95,23
bta-miR-376d	AUCAUAGAGGAAAAUCCACAU	0,000234	95,45
bta-miR-1271	CUUGGCACCUAGUAAGUACUCA	0,000252	90,91
bta-miR-383	AGAUCAGAAGGUGAUUGUGGCU	0,000263	100,00
bta-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	0,00028	100,00
bta-miR-99a-3p	CAAGCUCGCUUCUAUGGGU	0,000293	86,36
bta-miR-652	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	0,000295	100,00
bta-miR-200c	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA	0,000304	100,00
bta-miR-505	CGUCAACACUUGCUGGUUUCCU	0,00037	100,00
bta-miR-496	UGAGUAUUACAUGGCCAAUCUC	0,000404	100,00

Continua

Continuação

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-9-3p	AUAAAGCUAGAUAACCG	0,000477	72,27
bta-miR-411c-3p	UGUAUGUCAACUGAUCCACAGU	0,000502	ND
bta-miR-331-5p	UCUAGGUAUGGUCCCAGG	0,000512	77,27
bta-miR-758	UUUGUGACCUGGUCCACUAACC	0,000523	100,00
bta-miR-302c	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	0,000551	100,00
bta-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	0,000641	100,00
bta-miR-491	AGUGGGGAACCCUUCCAUGAGG	0,000658	100,00
bta-miR-544a	AUUCUGCAUUUUUAGCAAGUUC	0,000659	100,00
bta-miR-218	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGUG	0,00067	95,45
bta-miR-448	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCAU	0,000761	100,00
bta-miR-452	UGUUUGCAGAGGAAACUGAGAC	0,000806	86,36
bta-miR-338	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA	0,000808	95,65
bta-miR-376a	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	0,000867	100,00
bta-miR-301a	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAGCAU	0,000868	92,00
bta-miR-490	CAACCUGGAGGACUCCAUGCUG	0,000885	100,00
bta-miR-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACUG	0,000929	95,65
bta-miR-138	AUCUCAGGUUUGUCAGCCCGCA	0,001006	ND
bta-miR-379	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	0,001034	100,00
bta-miR-449b	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC	0,001115	100,00
bta-miR-34b	AGGCAGUGUAAUUAGCUGAUUG	0,001116	13,04
bta-miR-190b	UGAUAUGUUUGAUAUUGGGUU	0,001153	100,00
bta-miR-196b	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGGA	0,001229	95,65
bta-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACACU	0,001266	95,45
bta-miR-187	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	0,001268	100,00
bta-miR-545-3p	AUCAACAAACAUUUAUUGUGUG	0,001289	86,36
bta-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU	0,001308	95,83
bta-miR-764	GGUGCUCACUCGUCCUUCU	0,001326	77,27
bta-miR-431	UGUCUUGCAGGCCGUCAUGCAGG	0,001341	95,65
bta-miR-1287	UGCUGGAUCAGUGGUUUGAGUC	0,001346	95,45
bta-miR-28	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	0,001364	100,00
bta-miR-133c	AUUUGGUUCCAUUUUACCAGC	0,001475	72,72

Continua

Continuação

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-495	AAACAAACAUGGUGCACUUCUU	0,001516	100,00
bta-miR-1284	UCUGCACAGACCCUGGCUUUUC	0,00172	90,91
bta-miR-95	UUCAACGGGUAUUUAUUGAGCA	0,001749	100,00
bta-miR-363	AUUGCACGGUAUCCAUCUGCG	0,00187	86,36
bta-miR-1179	AAGCAUUCUUUCAUUGGUUGG	0,001911	100,00
bta-miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	0,001935	100,00
bta-miR-1247-3p	CGGGAACGUCGGGACUGGAGC	0,002038	82,60
bta-miR-412	ACUUCACCUGGUCCACUAGCUGU	0,002115	95,65
bta-miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	0,002145	100,00
bta-miR-205	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	0,002177	100,00
bta-miR-769	UGAGACCUCCGGGUUCUGAGCU	0,002184	95,45
bta-miR-763	CCAGCUGGGAGGAACCAGUGGC	0,002207	ND
bta-miR-371	AAGUGCCGCCAUGUUUUGAGUGU	0,002219	83,33
bta-miR-409b	GGGGUUCACCGAGCAACAUUC	0,00233	ND
bta-miR-1301	UUGCAGCUGCCUAGGAGUGAUUUC	0,002338	91,66
bta-miR-545-5p	UCAGUAAAUGUUUAUUGGAUG	0,002343	90,90
bta-miR-301b	CAGUGCAAUGAUAUUGUCAAAGCAU	0,002365	91,66
bta-miR-211	UUCCCUUUGUCAUCCUUUGCC	0,002528	90,90
bta-miR-708	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGG	0,002549	100,00
bta-miR-34a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	0,002561	100.00
bta-miR-4523	GACCGAGAGGGCCUCGGCUGU	0,002649	100,00
bta-miR-186	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	0,002666	100,00
bta-miR-30b-5p	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	0,002797	100,00
bta-miR-410	AAUAUAACACAGAUGGCCUGU	0,00295	100,00
bta-miR-196a	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	0,00303	100,00
bta-miR-504	AGACCCUGGUCUGCACUCUGUC	0,003098	95,45
bta-miR-532	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	0,003275	100,00
bta-miR-654	UAUGUCUGCUGACCAUCACCUU	0,003312	100,00
bta-miR-761	GCAGCAGGGUGAAACUGACACA	0,003361	100,00
bta-miR-551a	GCGACCCAAUCUUGGUUUCCA	0,003521	95,23
bta-miR-493	UGAAGGUCUACUGUGUGCCAGG	0,003574	100,00

Continua

Continuação

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-873	GCAGGAACUUGUGAGUCUCCU	0,003645	100,00
bta-miR-1306	CCACCUCCCCUGCAAACGUCC	0,003646	95,45
bta-miR-328	CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU	0,003707	100,00
bta-miR-380-3p	UAUGUAAUGUGGUCCACGUCU	0,003882	83,36
bta-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGUGCU	0,003944	90,90
bta-miR-34c	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG	0,004247	96,65
bta-miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAG	0,00458	95,65
bta-miR-199b	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	0,004599	100,00
bta-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC	0,004608	100,00
bta-miR-455-5p	UAUGUGCCUUUGGACUACAUC	0,00463	95,45
bta-miR-1296	UUAGGGCCCUGGCUCCAUCUCC	0,004823	100,00
bta-miR-454	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU	0,004837	100,00
bta-miR-449c	AGGCAGUGCAUCUCUAGCUGG	0,005246	60,00
bta-miR-502a	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUCA	0,005246	100,00
bta-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG	0,005385	95,65
bta-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU	0,005977	100,00
bta-miR-378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	0,00643	100,00
bta-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUG	0,006662	95,45
bta-miR-876	UGGAUUUCUUUGUGAAUCACCA	0,006709	100,00
bta-miR-760-5p	CCCCUCAGUCCACCAGAGCCCG	0,006728	ND
bta-miR-411a	AUAGUAGACCGUAUAGCGUACG	0,006934	95,45
bta-miR-216a	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	0,006957	100,00
bta-miR-362-5p	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAGU	0,00712	100,00
bta-miR-21-3p	AACAGCAGUCGAUGGGCUGUCU	0,007207	81,81
bta-miR-342	UCUCACACAGAAAUCGCACCCAUCU	0,007309	95,65
bta-miR-374b	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	0,007366	100,00
bta-miR-885	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	0,007639	100,00
bta-miR-539	GGAGAAAUUAUCCUUGGUGUGU	0,007679	100,00
bta-miR-660	UACCCAUUGCAUAUCGGAGCUG	0,007686	95,45
bta-miR-432	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	0,007783	100,00
bta-miR-380-5p	UGGUUGACCAUAGAACAUGCGC	0,007841	100,00

Continua

Continuação

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-374a	UUAUAAUACAACCUGAUAAGUG	0,00837	100,00
bta-miR-330	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA	0,008703	100,00
bta-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGACA	0,00885	95,45
bta-miR-592	AUUGUGUCAAUAUGCGAUGAUGU	0,008869	95,65
bta-miR-216b	AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA	0,00889	100,00
bta-miR-378b	ACUUGACUUGGAGUCAGAAGGC	0,009007	77,27
bta-miR-154b	AGAGGUCUUCCAUGGUGCAUUCG	0,009493	ND
bta-miR-382	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	0,009802	100,00
bta-miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACUAG	0,01006	90,90
bta-miR-219-3p	AGAAUUGUGGCUGGACAUCUG	0,010087	95,45
bta-miR-23b-5p	GGGUUCCUGGCAUGCUGAUUU	0,01019	95,45
bta-miR-146b	UGAGAACUGAAUUCCAUAGGCUGU	0,010216	91,30
bta-miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU	0,010255	100,00
bta-miR-485	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUCG	0,010488	95,65
bta-miR-324	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU	0,010659	100,00
bta-miR-30f	UGUAAACACCCUACACUCUCAGCU	0,010779	91,66
bta-miR-154a	UAGGUUAUCCGUGUAGCCUUCG	0,01143	95,45
bta-miR-670	UCCCUGAGUAUAUGUGGUGAA	0,011484	Sem similaridade
bta-miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCCAG	0,011747	91,30
bta-miR-655	AUAAUACAUGGUUAACCUCUCU	0,011928	95,45
bta-miR-1307	ACUCGGCGUGGCGUCGGUCGUG	0,012642	100,00
bta-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	0,012697	100,00
bta-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	0,013357	100,00
bta-miR-424-3p	CAAAACGUGAGGCGCUGCUAU	0,014306	100,00
bta-miR-339a	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCAC	0,016506	95,65
bta-miR-92b	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	0,016656	100,00
bta-miR-503-3p	GGAGUAUUGUUUCUGCUGCCCGG	0,016968	86,95
bta-miR-378d	CUGGACUUGGAGUCAGAAGACC	0,017161	77,27
bta-miR-487b	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	0,01742	100,00
bta-miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGUU	0,017469	95,65
bta-miR-146a	UGAGAACUGAAUUCCAUAGGUUGU	0,017638	87,50

Continua

miRNA bovino	*Sequência*	*p-value*	*Homologia com sequência humana (%)*
bta-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGUGG	0,018352	95,45
bta-miR-502b	AAUCCACCUGGGCAAGGAUUC	0,019794	90,47
bta-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	0,02035	100,00
bta-miR-381	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUGU	0,020414	100,00
bta-miR-33a	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	0,022034	100.00
bta-miR-30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	0,022044	100,00
bta-miR-658	GGCGGAGGGAAGCGGGUCCGUUGGU	0,023015	92,00
bta-miR-190a	UGAUAUGUUUGAUAUAUUAGGU	0,024381	100,00
bta-miR-453	AGGUUGUCCGUGGUGAGUUCGCA	0,024871	100,00
bta-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC	0,025773	95,65
bta-miR-152	UCAGUGCAUGACAGAACUUGGG	0,026264	95,45
bta-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACCAC	0,028268	91,30
bta-miR-362-3p	AACACACCUAUUCAAGGAUUC	0,028292	95,65
bta-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCCG	0,028302	95,23
bta-miR-199c	UACAGUAGUCUGCACAUUGG	0,028354	86,36
bta-miR-489	GUGACAUCACAUAUAUGGCGAC	0,029644	86,36
bta-miR-126-3p	CGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	0,030061	95,62
bta-miR-3064	UUGCCACACUGCAACACCUUACA	0,034219	100,00
bta-miR-541	UGGUGGGCACAGAAUCCGGCCU	0,035291	90,90
bta-miR-551b	GGCGACCCAUACUUGGUUUCAG	0,039712	100,00
bta-miR-1388-3p	AUCUCAGGUUUGUCAGCCCGCA	0,040233	ND
bta-miR-195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGCA	0,044762	95,45
bta-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	0,046834	100,00
bta-miR-197	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	0,048983	100,00

Os valores de p (p-value) são oriundos do teste de comparação entre médias dos valores de expressão relativa entre VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4. A homologia com a sequência humana indica a similaridade entre os miRNAs bovinos e humanos. ND= Não detectado

Apêndice F – Perfil de miRNAs maduros detectados em células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs ou adição de VEs pequenas dos grupos baixa e alta P4 durante 9 horas de maturação *in vitro*. **(A)** Representação da média do Ct e desvio padrão (±DP) dos miRNAs quando considerados presentes no grupo. A presença do miRNA em cada grupo foi determinada se presente em 3 ou mais amostras. Os pontos indicam que o miRNA foi considerado ausente. **(B)** MiRNAs considerados diferentes entre os grupos (p<0,05). **(C)** Representação gráfica da expressão relativa dos miRNAs diferentes entre células do cumulus expostas a diferentes suplementações.

A

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
	CT		DP	CT		DP	CT		DP
bta-let-7a-3p	30,675	±	2,552	31,695	±	1,301	.	±	.
bta-miR-103	29,674	±	2,464	.	±	.	32,092	±	2,787
bta-let-7a-5p	23,639	±	1,647	.	±	.	26,481	±	2,501
bta-miR-105a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-let-7b	26,027	±	1,465	27,489	±	0,739	29,372	±	2,439
bta-miR-105b	.	±	.	.	±	.	35,844	±	1,352
bta-let-7c	24,268	±	1,390	25,681	±	0,035	27,274	±	2,288
bta-miR-106a	27,367	±	3,376	29,676	±	2,510	30,836	±	3,611
bta-let-7d	25,172	±	1,417	26,511	±	0,239	28,236	±	3,829
bta-miR-106b	30,106	±	4,378	31,802	±	2,255	.	±	.
bta-let-7e	24,004	±	1,413	24,749	±	0,374	25,872	±	1,945
bta-miR-107	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-let-7f	24,642	±	1,353	25,775	±	0,271	.	±	.
bta-miR-10a	28,471	±	1,827	29,551	±	0,687	.	±	.
bta-let-7g	.	±	.	27,753	±	1,299	28,751	±	2,537
bta-miR-10b	28,019	±	2,324	29,299	±	0,798	.	±	.
bta-let-7i	27,344	±	2,456	29,360	±	1,458	30,096	±	2,555
bta-miR-122	.	±	.	34,304	±	.	.	±	.
bta-miR-1	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-124a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-100	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-124b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-101	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-125a	24,758	±	2,461	.	±	.	28,650	±	5,123
bta-miR-125b	27,168	±	3,596	28,794	±	1,898	32,239	±	4,583

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-133b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-126-3p	32,456	±	0,810	31,730	±	0,144	32,138	±	0,521
bta-miR-133c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-126-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-134	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-127	31,176	±	1,197	31,472	±	0,523	31,670	±	0,866
bta-miR-135a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-128	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-135b	34,317	±	0,483	.	±	.	.	±	.
bta-miR-129	.	±	.	34,757	±	0,829	.	±	.
bta-miR-136	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-129-3p	35,574	±	1,757	.	±	.	35,618	±	0,968
bta-miR-137	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-129-5p	34,015	±	1,509	34,263	±	0,428	.	±	.
bta-miR-138	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-130a	.	±	.	31,299	±	0,693	.	±	.
bta-miR-139	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-130b	25,892	±	1,789	27,251	±	1,341	.	±	.
bta-miR-140	.	±	.	33,459	±	1,289	32,899	±	2,091
bta-miR-132	26,882	±	2,077	28,163	±	0,814	.	±	.
bta-miR-141	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-133a	34,047	±	2,191	.	±	.	.	±	.
bta-miR-142-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-142-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-151-3p	29,660	±	2,064	30,997	±	1,141	31,835	±	2,978
bta-miR-143	30,154	±	1,590	31,753	±	1,122	33,395	±	2,677
bta-miR-151-5p	28,355	±	1,786	29,762	±	1,058	32,272	±	2,838
bta-miR-144	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-152	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-145	35,450	±	1,293	34,373	±	1,696	36,173	±	0,765
bta-miR-153	30,930	±	1,548	32,862	±	1,751	34,179	±	1,936
bta-miR-146a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-154a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-146b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-154b	31,109	±	1,008	31,036	±	1,116	31,063	±	1,134
bta-miR-147	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-154c	.	±	.	35,633	±	0,993	34,867	±	1,194
bta-miR-148a	.	±	.	30,138	±	1,872	.	±	.

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-155	24,371	±	0,686	25,099	±	0,429	25,610	±	0,182
bta-miR-148b	29,079	±	3,604	.	±	.	.	±	.
bta-miR-15a	30,813	±	3,468	33,196	±	2,558	.	±	.
bta-miR-149-3p	31,902	±	1,164	33,573	±	1,036	34,565	±	2,058
bta-miR-15b	25,710	±	2,066	26,978	±	1,052	29,320	±	3,100
bta-miR-149-5p	33,697	±	1,684	.	±	.	.	±	.
bta-miR-16a	26,549	±	3,176	28,410	±	1,914	29,888	±	4,043
bta-miR-150	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-16b	25,217	±	3,075	27,336	±	1,965	29,963	±	4,089
bta-miR-17-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-188	32,573	±	1,691	.	±	.	.	±	.
bta-miR-17-5p	29,202	±	3,646	31,928	±	2,337	.	±	.
bta-miR-18a	30,711	±	2,862	.	±	.	.	±	.
bta-miR-181a	32,651	±	1,764	35,613	±	1,412	.	±	.
bta-miR-18b	32,306	±	2,758	.	±	.	.	±	.
bta-miR-181b	30,292	±	1,436	32,023	±	0,716	32,755	±	1,444
bta-miR-190a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-181c	33,625	±	2,685	.	±	.	.	±	.
bta-miR-190b	31,223	±	0,789	32,737	±	1,640	.	±	.
bta-miR-181d	30,383	±	1,335	31,655	±	0,145	32,969	±	2,283
bta-miR-191	28,001	±	2,052	29,224	±	1,299	30,473	±	3,037
bta-miR-182	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-192	.	±	.	35,744	±	1,548	.	±	.
bta-miR-183	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-193a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-184	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-193a-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-185	31,886	±	2,032	33,416	±	1,154	.	±	.
bta-miR-193a-5p	29,772	±	0,858	30,716	±	0,094	31,799	±	1,127
bta-miR-186	.	±	.	32,969	±	2,285	33,705	±	3,196
bta-miR-193b	33,884	±	1,690	.	±	.	.	±	.
bta-miR-187	32,779	±	1,700	33,523	±	1,877	34,363	±	1,897
bta-miR-194	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-195	26,039	±	2,893	27,305	±	2,141	.	±	.
bta-miR-200c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-196a	31,256	±	0,380	31,853	±	0,958	33,545	±	1,156
bta-miR-202	23,018	±	2,704	24,677	±	1,394	27,478	±	5,427
bta-miR-196b	32,453	±	1,102	32,104	±	0,570	34,164	±	1,551

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-204	32,727	±	0,828	.	±	.	.	±	.
bta-miR-197	27,334	±	1,272	28,972	±	0,725	29,995	±	1,443
bta-miR-205	34,869	±	1,937	.	±	.	.	±	.
bta-miR-199a-3p	31,930	±	1,940	.	±	.	.	±	.
bta-miR-206	.	±	.	34,647	±	1,231	.	±	.
bta-miR-199a-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-208a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-199b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-208b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-199c	30,967	±	2,514	33,275	±	1,287	33,180	±	2,168
bta-miR-20a	27,475	±	3,437	29,470	±	1,819	.	±	.
bta-miR-19a	28,387	±	4,381	31,819	±	3,602	.	±	.
bta-miR-20b	28,921	±	3,334	31,298	±	1,871	.	±	.
bta-miR-19b	29,425	±	5,804	32,425	±	3,809	.	±	.
bta-miR-21-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-200a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-21-5p	27,730	±	2,187	28,902	±	0,955	.	±	.
bta-miR-200b	29,736	±	1,513	31,188	±	1,248	31,704	±	2,550
bta-miR-210	.	±	.	31,087	±	0,645	32,624	±	2,623
bta-miR-211	33,082	±	2,750	.	±	.	.	±	.
bta-miR-22-5p	32,632	±	2,116	.	±	.	.	±	.
bta-miR-212	32,429	±	1,573	34,796	±	1,850	.	±	.
bta-miR-221	30,562	±	2,395	31,875	±	1,675	32,544	±	2,477
bta-miR-214	33,120	±	2,032	35,124	±	1,086	.	±	.
bta-miR-222	29,369	±	1,809	30,690	±	1,109	30,702	±	1,757
bta-miR-215	32,635	±	1,512	34,604	±	0,937	.	±	.
bta-miR-223	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-216a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-224	29,859	±	1,518	31,442	±	0,555	32,416	±	2,453
bta-miR-216b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-23a	24,570	±	0,285	26,477	±	0,490	28,603	±	3,203
bta-miR-217	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-23b-3p	26,669	±	0,424	28,597	±	0,481	29,797	±	2,746
bta-miR-218	30,775	±	1,023	31,420	±	0,572	32,991	±	3,283
bta-miR-23b-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-219	.	±	.	34,750	±	1,527	.	±	.
bta-miR-24	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-219-3p	31,908	±	1,615	33,702	±	1,741	34,370	±	1,940

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-24-3p	28,339	±	2,677	29,937	±	1,482	31,955	±	3,062
bta-miR-219-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-25	26,002	±	1,602	27,141	±	0,789	30,268	±	4,036
bta-miR-22-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-26a	25,139	±	2,693	26,669	±	1,367	28,143	±	3,545
bta-miR-26b	26,962	±	2,042	28,078	±	1,147	30,730	±	3,458
bta-miR-29d-3p	31,734	±	3,004	.	±	.	.	±	.
bta-miR-26c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-29d-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-27a-3p	29,270	±	3,296	30,776	±	2,107	.	±	.
bta-miR-29e	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-27a-5p	33,324	±	2,065	29,239	±	8,944	8,073	±	1,508
bta-miR-301a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-27b	28,867	±	2,315	30,399	±	1,478	31,928	±	3,405
bta-miR-301b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-28	32,932	±	2,275	.	±	.	.	±	.
bta-miR-302a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-296-3p	30,959	±	1,084	32,165	±	1,082	32,105	±	0,783
bta-miR-302b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-296-5p	32,314	±	2,057	33,774	±	1,741	.	±	.
bta-miR-302c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-299	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-302d	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-29a	29,379	±	3,971	31,842	±	2,736	.	±	.
bta-miR-3064	34,751	±	1,447	35,131	±	1,478	.	±	.
bta-miR-29b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-30a-5p	29,432	±	3,565	31,899	±	2,660	32,931	±	4,190
bta-miR-29c	29,026	±	3,861	31,878	±	2,791	.	±	.
bta-miR-30b-3p	33,891	±	1,671	.	±	.	.	±	.
bta-miR-30b-5p	28,226	±	3,614	30,814	±	2,489	.	±	.
bta-miR-328	32,819	±	1,155	33,793	±	0,845	34,217	±	1,427
bta-miR-30c	27,063	±	3,157	28,870	±	1,914	.	±	.
bta-miR-329a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-30d	28,084	±	2,553	31,441	±	2,112	32,346	±	3,527
bta-miR-329b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-30e-5p	29,321	±	3,443	31,478	±	1,871	32,542	±	3,292
bta-miR-330	33,598	±	1,728	.	±	.	.	±	.
bta-miR-30f	28,287	±	3,264	30,073	±	1,840	31,290	±	3,622

Continua

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-331-3p	32,124	±	2,000	.	±	.	.	±	.
bta-miR-31	25,980	±	2,670	27,786	±	1,200	30,099	±	3,338
bta-miR-331-5p	31,983	±	1,162	33,252	±	1,393	33,367	±	0,881
bta-miR-32	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-335	30,507	±	2,731	32,509	±	2,649	33,684	±	3,087
bta-miR-320a	27,451	±	1,175	28,587	±	0,250	30,112	±	2,348
bta-miR-338	33,825	±	1,723	34,745	±	0,721	.	±	.
bta-miR-320b	35,062	±	1,754	35,929	±	0,452	.	±	.
bta-miR-339a	31,765	±	3,929	32,789	±	1,019	34,104	±	2,718
bta-miR-323	17,044	±	0,380	16,954	±	0,439	16,771	±	0,297
bta-miR-339b	29,969	±	3,100	31,780	±	2,035	33,688	±	3,424
bta-miR-324	.	±	.	34,337	±	0,333	.	±	.
bta-miR-33a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-326	33,342	±	2,346	35,219	±	0,556	.	±	.
bta-miR-33b	35,126	±	1,607	35,839	±	0,600	35,538	±	1,397
bta-miR-340	33,262	±	1,734	.	±	.	.	±	.
bta-miR-365-3p	28,148	±	3,263	29,500	±	1,574	.	±	.
bta-miR-342	29,625	±	2,915	31,358	±	1,165	.	±	.
bta-miR-365-5p	33,527	±	1,916	34,414	±	1,678	.	±	.
bta-miR-345-3p	33,752	±	0,891	.	±	.	.	±	.
bta-miR-367	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-345-5p	33,843	±	1,543	34,706	±	1,939	.	±	.
bta-miR-369-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-346	32,369	±	1,540	33,667	±	1,372	.	±	.
bta-miR-369-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-34a	31,930	±	2,072	33,039	±	1,601	33,341	±	1,807
bta-miR-370	33,982	±	1,937	34,588	±	1,059	34,546	±	1,731
bta-miR-34b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-371	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-34c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-374a	29,665	±	2,552	31,695	±	1,923	.	±	.
bta-miR-361	28,807	±	1,098	29,715	±	0,766	30,485	±	0,839
bta-miR-374b	27,790	±	2,086	29,487	±	1,316	.	±	.
bta-miR-362-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-375	31,330	±	0,500	30,422	±	0,812	29,767	±	0,539
bta-miR-362-5p	32,217	±	2,206	34,038	±	1,949	.	±	.
bta-miR-376a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-363	.	±	.	.	±	.	.	±	.

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-376b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-376c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-382	29,724	±	1,041	30,157	±	0,545	30,768	±	1,004
bta-miR-376d	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-383	.	±	.	35,217	±	1,783	.	±	.
bta-miR-376e	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-409a	.	±	.	34,901	±	0,638	.	±	.
bta-miR-377	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-409b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-378	31,413	±	1,982	32,567	±	0,883	32,865	±	1,972
bta-miR-410	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-378b	31,833	±	2,003	32,825	±	0,830	33,822	±	1,835
bta-miR-411a	.	±	.	32,678	±	0,490	33,380	±	0,450
bta-miR-378c	33,132	±	1,019	33,917	±	0,091	.	±	.
bta-miR-411b	.	±	.	36,328	±	0,055	35,447	±	0,640
bta-miR-378d	33,784	±	1,087	34,209	±	0,845	34,154	±	0,760
bta-miR-411c-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-379	33,981	±	1,071	.	±	.	.	±	.
bta-miR-411c-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-380-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-412	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-380-5p	34,735	±	0,862	34,409	±	1,709	.	±	.
bta-miR-421	28,927	±	2,006	28,981	±	1,073	30,449	±	2,096
bta-miR-381	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-423-3p	30,133	±	2,854	32,468	±	2,026	.	±	.
bta-miR-423-5p	28,707	±	1,394	30,137	±	0,302	30,695	±	1,069
bta-miR-449c	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-424-3p	33,691	±	0,787	.	±	.	.	±	.
bta-miR-449d	32,302	±	1,931	33,219	±	0,891	33,023	±	0,916
bta-miR-424-5p	29,910	±	2,899	33,632	±	2,892	.	±	.
bta-miR-450a	32,577	±	1,408	.	±	.	.	±	.
bta-miR-425-3p	30,010	±	2,161	30,588	±	1,172	32,202	±	2,473
bta-miR-450b	32,773	±	0,866	34,425	±	0,936	.	±	.
bta-miR-425-5p	31,648	±	3,762	32,851	±	1,979	.	±	.
bta-miR-451	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-429	30,744	±	0,771	30,683	±	0,616	30,759	±	0,665
bta-miR-452	33,714	±	2,070	34,202	±	0,487	.	±	.
bta-miR-431	33,645	±	1,356	.	±	.	34,977	±	0,871

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-4523	35,243	±	1,071	35,333	±	1,206	.	±	.
bta-miR-432	34,753	±	1,559	.	±	.	.	±	.
bta-miR-453	34,878	±	2,129	34,750	±	1,310	34,565	±	1,150
bta-miR-433	30,741	±	0,880	30,317	±	0,645	30,831	±	0,913
bta-miR-454	32,345	±	0,967	33,472	±	0,852	.	±	.
bta-miR-448	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-455-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-449a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-455-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-449b	.	±	.	35,549	±	1,860	.	±	.
bta-miR-483	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-484	30,805	±	2,404	33,980	±	1,232	33,908	±	2,633
bta-miR-496	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-485	34,932	±	1,084	34,774	±	0,908	35,583	±	1,139
bta-miR-497	30,755	±	3,129	32,893	±	2,177	34,360	±	2,875
bta-miR-486	32,078	±	1,683	34,898	±	2,519	.	±	.
bta-miR-499	33,979	±	2,274	.	±	.	.	±	.
bta-miR-487a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-500	29,793	±	1,378	32,906	±	1,065	.	±	.
bta-miR-487b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-502a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-488	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-502b	32,159	±	1,685	33,761	±	1,582	.	±	.
bta-miR-489	31,826	±	0,734	31,041	±	0,327	31,418	±	0,896
bta-miR-503-3p	31,760	±	1,624	33,503	±	0,575	34,823	±	1,697
bta-miR-490	.	±	.	35,470	±	0,962	.	±	.
bta-miR-503-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-491	30,497	±	1,159	31,203	±	0,568	31,861	±	1,632
bta-miR-504	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-493	31,971	±	1,173	32,448	±	1,145	33,109	±	1,634
bta-miR-505	28,257	±	1,282	31,328	±	1,640	.	±	.
bta-miR-494	27,978	±	1,037	28,162	±	0,672	28,458	±	0,548
bta-miR-532	32,039	±	2,217	33,417	±	1,145	.	±	.
bta-miR-495	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-539	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-541	31,453	±	0,619	31,100	±	0,748	31,594	±	1,011
bta-miR-582	32,745	±	0,170	32,566	±	0,620	.	±	.
bta-miR-542-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-584	33,115	±	0,991	34,831	±	1,303	.	±	.
bta-miR-543	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-592	33,993	±	2,264	.	±	.	.	±	.
bta-miR-544a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-599	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-544b	34,297	±	1,166	.	±	.	.	±	.
bta-miR-615	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-545-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-628	.	±	.	34,157	±	0,614	34,483	±	0,737
bta-miR-545-5p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-631	20,115	±	0,286	19,930	±	0,347	19,888	±	0,398
bta-miR-551a	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-652	29,315	±	0,542	32,006	±	1,066	31,932	±	1,479
bta-miR-551b	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-653	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-562	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-654	34,399	±	2,537	34,559	±	0,679	.	±	.
bta-miR-568	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-655	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-574	26,777	±	1,614	27,601	±	0,525	28,971	±	1,487
bta-miR-656	32,031	±	1,074	31,924	±	0,721	32,223	±	1,026
bta-miR-658	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-758	33,396	±	1,792	32,945	±	1,889	.	±	.
bta-miR-660	29,627	±	1,569	.	±	.	.	±	.
bta-miR-759	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-664a	31,384	±	2,138	33,583	±	0,635	35,301	±	1,462
bta-miR-760-3p	.	±	.	34,159	±	0,871	.	±	.
bta-miR-664b	28,284	±	1,399	29,438	±	1,039	31,819	±	3,165
bta-miR-760-5p	29,403	±	2,103	30,607	±	1,714	31,602	±	2,550
bta-miR-665	30,448	±	2,038	31,496	±	0,716	31,816	±	1,566
bta-miR-761	34,333	±	1,680	.	±	.	.	±	.
bta-miR-669	31,666	±	1,917	.	±	.	34,638	±	2,614
bta-miR-763	34,092	±	1,894	35,178	±	1,038	.	±	.
bta-miR-670	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-764	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-671	33,719	±	0,578	.	±	.	.	±	.
bta-miR-767	31,981	±	1,243	31,811	±	0,863	32,233	±	1,013
bta-miR-677	31,658	±	2,858	33,069	±	1,808	.	±	.

Continua

Continuação

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-769	32,824	±	1,758	.	±	.	.	±	.
bta-miR-7	31,722	±	2,032	32,684	±	1,307	.	±	.
bta-miR-873	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-708	31,732	±	1,526	33,383	±	2,173	34,296	±	2,124
bta-miR-874	32,997	±	2,060	34,687	±	0,729	.	±	.
bta-miR-744	29,263	±	0,733	30,046	±	0,373	29,851	±	0,739
bta-miR-875	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-876	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-98	29,138	±	2,066	29,971	±	0,601	31,003	±	2,012
bta-miR-877	33,012	±	2,104	33,296	±	0,806	.	±	.
bta-miR-99a-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-885	33,796	±	1,952	.	±	.	.	±	.
bta-miR-99a-5p	30,023	±	3,973	32,164	±	2,964	.	±	.
bta-miR-9-3p	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-9-5p	29,162	±	1,081	29,983	±	0,738	.	±	.
bta-miR-1179	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-92a	25,917	±	2,250	27,375	±	1,108	.	±	.
bta-miR-1185	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-92b	28,627	±	1,632	29,236	±	0,716	.	±	.
bta-miR-1193	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-93	28,924	±	2,768	30,459	±	1,355	31,129	±	2,343
bta-miR-1197	.	±	.	35,361	±	.	.	±	.
bta-miR-935	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-122	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-940	28,420	±	2,052	29,556	±	1,268	31,673	±	2,925
bta-miR-1224	31,368	±	2,093	31,614	±	0,473	33,314	±	1,289
bta-miR-95	35,174	±	1,475	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1225-3p	29,915	±	2,619	30,965	±	0,936	31,866	±	1,629
bta-miR-96	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1246	23,690	±	0,852	22,891	±	0,576	24,162	±	1,061
bta-miR-1247-3p	31,580	±	1,140	31,768	±	0,746	32,211	±	0,585
bta-miR-1296	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1247-5p	32,633	±	1,921	33,265	±	1,001	.	±	.
bta-miR-1298	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1248	32,089	±	2,481	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1301	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1249	32,165	±	0,577	34,522	±	0,137	.	±	.
bta-miR-1306	29,337	±	1,262	30,316	±	0,416	.	±	.

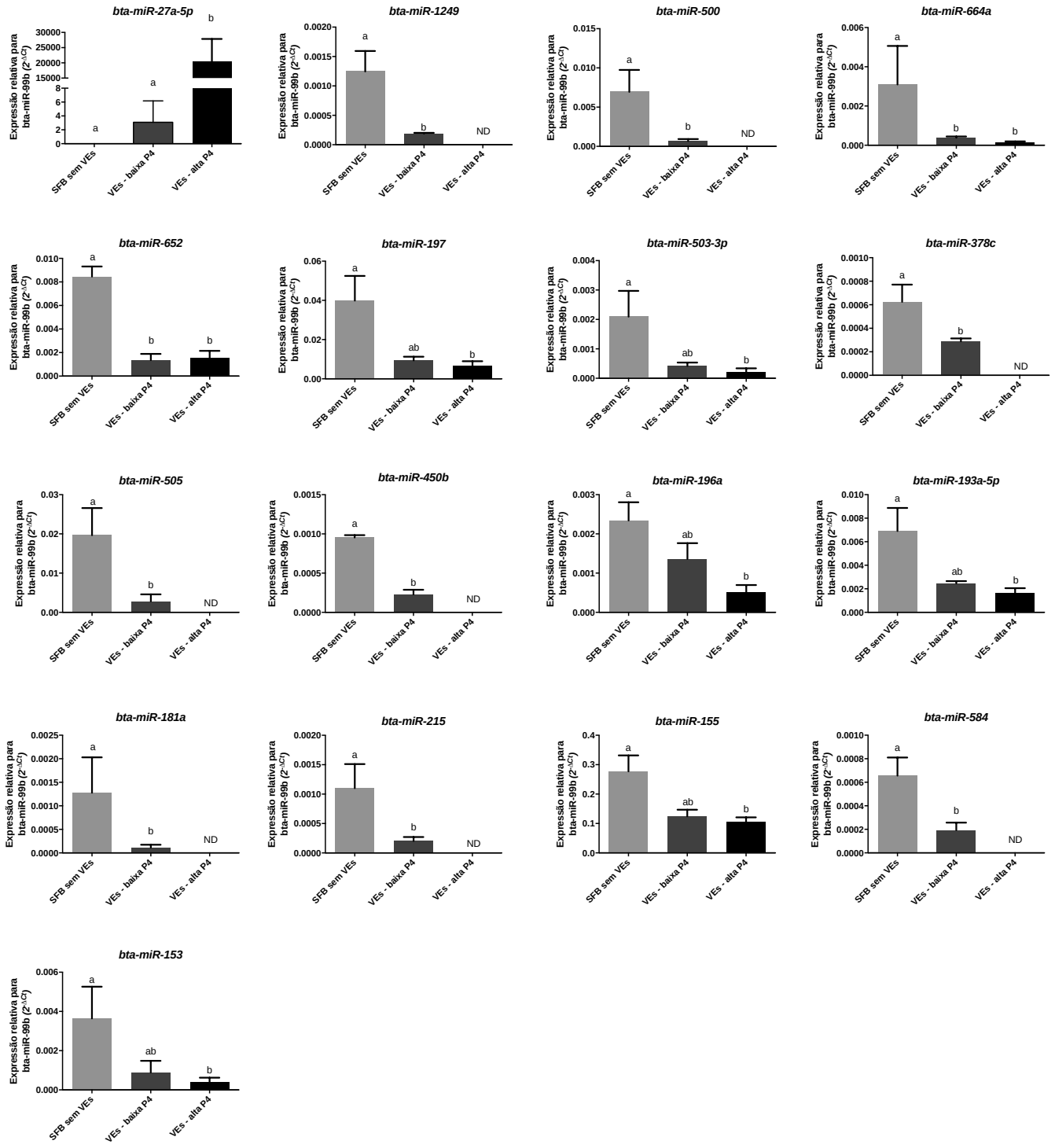
Continua

miRNA maduro	SFB sem VEs			VEs – baixa P4			VEs – alta P4		
bta-miR-1260b	24,246	±	1,741	25,488	±	0,659	27,332	±	2,925
bta-miR-1307	30,617	±	1,661	31,003	±	0,858	32,683	±	2,420
bta-miR-1271	33,111	±	2,099	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1343-3p	30,825	±	1,359	31,442	±	0,971	.	±	.
bta-miR-1277	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-1343-5p	31,225	±	1,913	32,348	±	1,170	33,419	±	2,082
bta-miR-1281	31,329	±	1,824	32,065	±	1,577	32,840	±	1,762
bta-miR-1388-3p	32,791	±	1,484	32,926	±	0,684	34,163	±	1,157
bta-miR-1282	.	±	.	.	±	.	.	±	.
RNT43 snoRNA	27,102	±	3,293	29,718	±	2,451	.	±	.
bta-miR-1284	.	±	.	.	±	.	.	±	.
Hm/Ms/Rt T1 snRNA	20,141	±	3,035	22,741	±	2,014	25,571	±	3,564
bta-miR-1287	34,337	±	1,494	35,228	±	0,456	.	±	.
bta-miR-1291	.	±	.	.	±	.	.	±	.
BRANCO	.	±	.	.	±	.	.	±	.
bta-miR-99b	22,322	±	0,386	22,036	±	0,279	0,360	±	0,394
bta-miR-99b	22,511	±	0,382	22,249	±	0,276	0,336	±	0,416

B

miRNAs diferentes	*Valor de p*	*Alvos de interesse*
bta-miR-27a-5p	0,0008	
bta-miR-1249	0,0026	
bta-miR-500	0,0053	*PTEN*
bta-miR-664a	0,0084	
bta-miR-652	0,0145	
bta-miR-197	0,0168	*EIF4E*
bta-miR-503-3p	0,0171	
bta-miR-378c	0,0175	
bta-miR-505	0,0192	
bta-miR-450b	0,0204	*EIF4E*
bta-miR-196a	0,0211	
bta-miR-193a-5p	0,0234	
bta-miR-181a	0,0256	*PTEN*
bta-miR-215	0,0285	
bta-miR-155	0,0296	
bta-miR-584	0,0351	*PTEN*
bta-miR-153	0,0460	*PTEN*

C



Os gráficos demonstram os valores transformados (2^-ΔCt). As barras representam a média e a barra de erro representa o erro padrão das médias (± EP). As letras diferentes indicam p <0,05. ND= não detectado. Fonte: Própria autoria.

Apêndice G – Lista dos genes diferencialmente expressos a partir do sequenciamento de RNA em células do cumulus suplementadas com SFB sem VEs ou VEs do grupo baixa e alta P4 durante 9 horas de maturação *in vitro*. As marcações em vermelho representam os genes aumentados, enquanto as marcações em azul representam os genes diminuídos no primeiro grupo do contraste em comparação ao segundo grupo.

VEs x SFB sem VEs		VEs- baixa P4 x SFB sem VEs		VEs-alta P4 x SFB sem VEs		VEs - baixa P4 x VEs - alta P4	
Gene	**p-ajustado**	**Gene**	**p-ajustado**	**Gene**	**p-ajustado**	**Gene**	**p-ajustado**
TM4SF19	0,020	TM4SF19	0,080	TM4SF19	0,035	LNP1	0,090
TMEM108	0,053	TNFSF10	0,073	TMEM108	0,088	TNFSF10	0,075
LOC101906009	0,026	TM4SF1	0,008	LOC101906009	0,031	TM4SF1	0,013
ZXDB	0,096	GRIA3	7,77E-08	ASB9	0,003	KLF8	0,037
PTPN18	0,043	PTPN18	0,065	DLX2	0,069	GALNT13	0,063
SP140L	0,053	IGFBP2	0,004	CNKSR1	0,026	AOX1	0,048
ECEL1	0,061	SP140L	0,019	C3H1orf210	0,083	CLK1	1,36E-08
CNKSR1	0,010	ECEL1	0,051	COL9A2	0,004	RSRP1	0,009
FCER1G	0,089	TENT5B	0,082	CSAD	0,058	C1QC	0,075
SLC5A9	0,079	CNKSR1	0,048	KRT8	0,008	HSPA6	0,094
COL9A2	0,002	FCER1G	0,062	VDR	0,076	TMOD4	0,063
PDCD1	0,085	NUDT17	0,059	STAC3	0,057	GBP4	0,044
VDR	0,056	SASS6	0,042	NXPH4	0,002	GBP2	0,098
STAC3	0,013	COL9A2	0,031	DPPA3	2,60E-09	KRT76	0,095
NXPH4	0,003	LGR5	0,005	C1RL	0,092	LYSB	0,057
A2ML1	0,077	KRT76	0,089	CELSR1	0,049	PDK4	0,012
MIR2443	0,036	STAC3	0,032	SHANK3	0,046	IL6	0,026
C4H7orf57	0,097	NXPH4	0,064	C4H7orf57	0,027	ASIC3	0,071
TMEM140	0,064	A2M	0,040	LRRC61	0,091	CXCL2	0,065
ATG9B	0,024	DPPA3	0,000	ATG9B	0,025	GRO1	0,055
ASIC3	0,005	MIR2443	0,031	ARSJ	0,040	HSD17B11	0,002
GDF1	0,087	CFAP69	0,078	GDF1	0,069	LOC520584	0,094
ARRDC2	0,049	TMEM140	0,067	NOTCH3	0,081	LOC100297725	0,012
ANKLE1	0,080	ASIC3	0,001	EFNA2	0,031	ZNF554	0,100
NOTCH3	0,047	PRDM8	0,068	IL1RN	0,050	ACSL6	0,020
C7H19orf38	0,099	CA9	0,008	TOGARAM2	0,068	CD14	0,100
EFNA2	0,011	ADAMDEC1	0,096	PKN3	0,006	CD74	0,005
GDF9	0,092	IL11RA	0,045	PNPLA7	0,087	DQX1	0,056
PKN3	0,001	ARRDC2	0,045	ZBTB16	0,048	QPCT	0,010
ARL14EPL	0,097	ANKLE1	0,087	OXT	0,047	AKAP7	0,014
EHD4	0,032	EFNA2	0,040	TOX2	0,021	VNN2	0,000
ZBTB16	0,086	GDF9	0,076	TMEM65	0,097	PNLDC1	0,034
P4HA3	0,008	CD74	0,024	MMP17	0,062	L3HYPDH	0,068
SPEF1	0,069	NMUR2	0,043	RGMA	0,057	LOC100297513	0,034
FOXS1	0,046	CYP26B1	0,032	MT2A	0,000	GPR183	0,007
PABPC1L	0,044	PKN3	0,004	FHOD1	0,094	GGACT	0,035
MFSD3	0,054	AKAP7	0,062	ENKD1	0,077	KBTBD3	0,093
FAM72A	0,097	VNN2	0,001	ACP7	0,090	TRPC6	0,030

Continua

Continuação

VEs x SFB sem VEs		VEs- baixa P4 x SFB sem VEs		VEs-alta P4 x SFB sem VEs		VEs - baixa P4 x VEs - alta P4	
Gene	p-ajustado	Gene	p-ajustado	Gene	p-ajustado	Gene	p-ajustado
MMP17	0,072	ERMARD	0,046	HIPK4	0,044	CCDC82	0,036
YPEL1	0,027	EHD4	0,020	CCDC61	0,012	NCAM1	0,086
RGMA	0,052	SLC15A1	0,022	LMTK3	0,085	GAT	0,093
MAP4K1	0,088	P4HA3	0,020	CA11	0,041	PLXDC2	0,049
ACP7	0,057	FERMT1	0,094	GYS1	0,040	NAPB	0,015
TMEM91	0,094	SPEF1	0,100	CLEC11A	0,068	WISP1	0,047
CCDC61	0,005	FOXS1	0,073	ZNF628	0,008	HEY1	0,053
COX6B2	0,095	TGM2	0,004	LOC100301263	0,000	CDH17	0,002
HOXB2	0,093	PABPC1L	0,039	PPP1R1B	0,047	CCDC181	0,016
PPP1R1B	0,013	LRRC24	0,030	ASB16	0,011	PRG4	0,005
C1QL1	0,022	PTGS2	0,078	C1QL1	0,015	NIM1K	0,073
UNC13D	0,081	YPEL1	0,039	CABLES1	0,087	CERS3	0,063
ZNF521	0,076	CARTPT	0,067	C22H3orf67	0,075	BCL2A1	0,076
GNAL	0,097	CEP72	0,063	CAND2	0,009	TARSL2	0,000
C22H3orf67	0,088	ISG12(B)	0,088	LOC100126544	0,048	NLRC5	0,039
CAND2	0,046	SERPINA11	0,003	TNXB	0,015	MIR21	1,54E-07
LOC781663	0,008	NLRC5	0,052	RBM24	0,081	CCL4	0,055
CFB	0,082	IGFLR1	0,018	GAL3ST3	0,021	RSAD1	0,058
HSPA12A	0,078	CEACAM1	0,035	LRFN4	0,011	HOXB4	0,094
LRFN4	0,020	LOC514552	0,097	PITPNM1	0,004	CD300A	0,073
CHRM3	0,049	COX6B2	0,032	CHRM3	0,056	NEK10	0,087
MSS51	0,060	LOC100301263	5,70E-09	PALD1	0,073	RNF144B	0,080
PHKG1	0,074	MIR21	0,000	FAM149B1	0,050	ACSL5	0,073
KPNA7	0,100	SPNS2	0,076	NPRL3	0,020	IDO1	0,005
MRAP	0,082	XAF1	0,065	VASN	0,000	TCIM	0,000
CEP97	0,031	CD68	0,067	ZP2	8,81E-07	CAMK2N2	0,020
LPP	0,003	ADORA2B	0,073	ARMC5	0,032	NKAP	0,083
KLHL24	0,066	HOXB2	0,062	ZP3	1,19E-06	ASB9	0,018
CAPN6	0,000	PPP1R1B	0,034	LOC521224	0,098	KIAA1522	0,009
MGAT5	0,057	GSDMB	0,043	VGF	5,03E-07	AKR7A2	0,087
TMEM177	0,069	UNC13D	0,065	SLC12A9	0,002	NOS1AP	0,100
S100A4	0,052	ZNF521	0,056	CEP97	0,027	MEX3A	0,091
MAN1A2	7,79E-09	LOC781663	0,002	GTPBP8	0,037	SSBP3	0,099
TTLL7	0,073	LY6G5B	0,026	PLS1	0,088	ANKRD52	0,066
RASD2	0,001	AQP11	0,095	CAPN6	0,050	NUAK1	0,063
TFPI2	0,004	MSS51	0,029	TYW5	0,080	CBX6	0,066
CALD1	0,082	ZP2	2,27E-08	MAN1A2	0,000	RTL6	0,037
AGBL3	0,026	ZP3	1,00E-09	TTLL7	0,068	SHANK3	0,012
CORIN	0,087	ACHE	0,009	PMCH	0,080	UPP1	0,041
SLC4A4	0,018	ZDHHC23	0,091	RASD2	0,001	C4H7orf57	0,050
TMEM150C	0,033	LPP	0,002	EMP1	0,096	NRF1	0,032
PTAR1	0,098	ELF4	0,043	OLR1	0,002	PLXNA4	0,016
DCAF10	0,082	IDS	0,057	TFPI2	0,025	TADA2B	0,016
NFIX	0,067	SYTL4	0,099	PDK4	0,034	MAP1S	0,012
TMEM232	0,068	CAPN6	0,045	KLHL7	0,010	ANO8	0,068
REL	0,052	KIAA1522	0,031	CD36	0,072	PCDH1	0,059

Continua

Continuação

VEs x SFB sem VEs		VEs- baixa P4 x SFB sem VEs		VEs-alta P4 x SFB sem VEs		VEs - baixa P4 x VEs - alta P4	
Gene	p-ajustado	Gene	p-ajustado	Gene	p-ajustado	Gene	p-ajustado
ALK	0,075	EPB41	0,011	TSPAN12	0,064	SPRY4	0,053
RRM2	0,003	PAFAH2	0,096	SLC4A4	0,093	ABLIM3	
GGTA1	0,065	UHMK1	0,069	CXCL8	0,096	STRN	0,082
PLN	4,68E-09	MEX3A	0,099	CXCL3	0,068	ACYP2	0,047
TRAF3IP2	0,073	S100A4	0,044	TMEM150C	0,030	IL1RN	0,079
FOXO3	0,017	MAN1A2	0,003	PTAR1	0,085	ATOH8	0,041
ADGRG6	0,085	KRAS	0,068	DCAF10	0,066	DAB2IP	0,076
ZNF770	0,083	NPTXR	0,033	FKTN	0,028	CRB2	0,019
SLC30A4	0,087	RTL6	0,041	LOC100297725	0,055	PTGES	0,081
TSPAN18	0,071	TFPI2	0,023	HBEGF	0,005	SAMD5	0,066
FAM107B	0,071	KCND2	0,064	TMEM232	0,064	ULBP27	0,013
TKDP2	0,038	PLXNA4	0,030	QPCT	0,004	ZFHX2	0,025
FGG	0,075	CALD1	0,089	IL1B	0,075	ZNF609	0,081
LIFR	0,040	AGBL3	0,041	GGTA1	0,038	ATP11A	0,098
TC2N	0,019	GPRIN3	0,054	ZBTB43	0,061	BCL9L	0,070
TMEM100	0,036	FAM114A1	0,061	CACNA1B	0,081	PFKFB3	0,066
GALR1	0,004	SLC4A4	0,035	PLN	0,000	LOC515755	0,004
MAPK4	0,014	TADA2B	0,096	TRAF3IP2	0,097	OXT	0,098
EXOG	0,081	MAP1S	0,039	FOXO3	0,090	TP53INP2	0,007
ARHGEF3	0,066	NFIX	0,030	POPDC3	0,044	TMEM65	0,050
LOC100848815	0,009	SEPT8	0,035	ZC3H12D	0,028	ZFHX4	0,006
GFRA1	0,064	PCDH1	0,085	MAP2K5	0,068	MFSD4A	0,040
LSP1	0,087	RRM2	0,007	CYP19A1	0,008	SH2B3	0,067
MTMR7	0,033	RC3H2	0,058	GPR183	0,038	KIAA1671	0,001
SLC9A6	0,026	ZBTB34	0,073	TRPC6	0,085	GDNF	0,020
LOC112445029	0,026	PLN	0,003	NCAM1	0,044	KLHL25	0,001
		FOXO3	0,032	ACER3	0,047	PEAK1	0,082
		ZNF609	0,049	OTOR	0,099	ASB2	0,039
		KBTBD6	0,080	PLXDC2	0,028	MT1E	0,048
		KMT2A	0,062	MAP3K8	0,042	MT2A	0,013
		FAM107B	0,095	SPAG4	0,090	CDH16	0,000
		LOC515755	0,048	WISP1	0,055	GRIN2D	0,094
		RBBP9	0,085	DECR1	0,082	PRR12	0,026
		TP53INP2	0,050	PRG4	0,033	C19H17orf67	0,014
		CSMD3	0,053	FGG	0,037	HIC1	0,005
		RAB29	0,065	NIM1K	0,066	SOCS7	0,041
		CHML	0,058	LIFR	0,030	EPOP	0,070
		FAM20B	0,024	AMACR	0,034	THRA	0,067
		SERTAD4	0,020	TC2N	0,044	KCNH4	0,093
		SH2B3	0,000	CALB2	0,051	RAC3	0,095
		KIAA1671	0,052	TMEM100	0,023	SOCS3	0,057
		MCCC2	0,057	GALR1	0,010	GNA13	0,020
		BDP1	0,034	SYT4	0,044	ASXL3	0,028
		CHD2	0,062	MAPK4	0,049	ITIH4	0,086
		ZNF774	0,097	LOC100848815	0,063	DOCK3	0,055
		PEAK1	0,089	BOLA-DRA	0,079	LIMD1	0,045

Continua

Conclusão

VEs x SFB sem VEs		VEs- baixa P4 x SFB sem VEs		VEs-alta P4 x SFB sem VEs		VEs - baixa P4 x VEs - alta P4	
Gene	**p-ajustado**	**Gene**	**p-ajustado**	**Gene**	**p-ajustado**	**Gene**	**p-ajustado**
		NFATC3	0,058	GFRA1	0,079	CAND2	0,084
		SMPD3	0,044	ZNF248	0,071	BMP6	0,049
		C19H17orf67	0,024	IDO1	0,068	FRAT1	0,054
		SSH2	0,099			RAB38	0,045
		EPOP	0,064			ZNF703	0,090
		GALR1	0,042			CRAMP1	0,029
		DOK6	0,099			VGF	0,100
		APCDD1	0,001			MAFK	0,000
		MAPK4	0,057			MICALL2	0,026
		ARHGEF3	0,038				0,072
		BLA-DQB	0,060				
		LOC100848815	0,040				
		ARHGAP19	0,060				
		RAB38	0,073				
		VPS37C	0,050				
		LSP1	0,072				
		ADO	0,045				
		MTMR7	0,060				
		NME4	0,083				
		CRAMP1	0,077				
		SLC9A6	0,048				
		LOC112445029	0,048				

Apêndice H – Artigo publicado na revista Animal Reproduction (v.16, n.1, p.31-38, Jan/Mar. 2019).

DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0101

Anim. Reprod., v.16, n.1, p.31-38, Jan./Mar. 2019

Extracellular vesicles and its advances in female reproduction

Ana Clara Faquineli Cavalcante Mendes de Ávila[1], Gabriella Mamede Andrade[1], Alessandra Bridi[1], Lindsay Unno Gimenes[2], Flávio Vieira Meirelles[1], Felipe Perecin[1], Juliano Coelho da Silveira[1,§]

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.
[2]Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Reproduction, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University (Unesp), Jaboticabal, SP, Brazil.

Abstract

Intercellular communication is an essential mechanism for development and maintenance of multicellular organisms. Extracellular vesicles (EVs) were recently described as new players in the intercellular communication. EVs are double-membrane vesicles secreted by cells and are classified according to their biosynthesis, protein markers and morphology. These extracellular vesicles contain bioactive materials such as miRNA, mRNA, protein and lipids. These characteristics permit their involvement in different biological processes. Reproductive physiology is complex and involves constant communication between cells. Different laboratories have described the presence of EVs secreted by ovarian follicular cells, oviductal cells, *in vitro* produced embryos and by the endometrium, suggesting that EVs are involved in the development of gametes and embryos, in animals and humans. Therefore, is important to understand physiological mechanisms and contributions of EVs in female reproduction in order to develop new tools to improve *in vivo* reproductive events and assisted reproductive techniques (ARTs). This review will provide the current knowledge related to EVs in female reproductive tissues and their role in ARTs.

Keyworks: extracellular vesicles, intercellular communication, female reproduction.

Introduction

Intercellular communication is an important reproductive physiology event. Cells that form reproductive tissues and structures are in constant interaction influenced by endocrine, paracrine and autocrine signaling (Albertini and Rider, 1994; Kretser *et al*., 2002). Besides the traditional forms of intercellular communication several studies have described extracellular vesicles (EVs) mediating the crosstalk between cells within or among tissues (da Silveira *et al*., 2012; Al-dossary *et al*., 2013; Ruiz-Gonzalez *et al*., 2015). Extracellular vesicles are nanoparticles secreted by different cell types (György *et al*., 2011; Raposo and Stoorvogel, 2013) and contains bioactive molecules such as mRNAs, microRNAs and proteins, which participate in the intercellular communication (Valadi *et al*., 2007; Simpson *et al*., 2008).

Extracellular vesicles secretion has been described in diverse reproductive cells as follicular cells (da Silveira *et al*., 2012), oviductal cells (Al-dossary *et al*., 2013), embryos produced *in vitro* (Mellisho *et al*., 2017) and endometrium cells (Ng *et al*., 2013). Moreover, many reproductive physiological functions are associated with EVs. These functions include ovarian follicle development, oocyte maturation and fertilization, early embryo development and endometrial–conceptus crosstalk (da Silveira *et al*., 2012; Al-dossary *et al*., 2013; Ruiz-Gonzalez *et al*., 2015; Hung *et al*., 2015; Lopera-vásquez *et al*., 2016). Moreover, EVs has also emerged as a potential *in vitro*-tool to improve assisted reproductive techniques (ARTs).

Assisted reproductive techniques are frequently used in animals and humans (Sirard, 2018). The principals of its use are to improve reproductive efficiency and as an alternative to infertility (Bousquet *et al*., 1999). However, exposure of gametes and early embryos to the *in vitro* environment influences embryo quality, RNA expression and ultrastructure patterns (Rizos *et al*., 2002a,b). These changes could cause pregnancy losses and can affect the health of generated individuals (Urrego *et al*., 2014; Bouillon *et al*., 2016). Therefore, is important to understand the physiological events in order to improve ARTs by mimicking *in vitro* the physiological conditions.

In summary, ARTs are important reproductive techniques; however, the *in vitro* environment can negatively affect gametes, embryo development and pregnancy establishment. One of the reasons is related to the lack of physiological mechanisms such as intercellular communication. Extracellular vesicles are carriers of molecules and were demonstrated to affect follicle development, oocyte maturation, embryo production and endometrial-conceptus communication. Then, this review will demonstrate the main studies describing EVs related to female reproductive tract and their impact in ARTs.

Extracellular vesicles characterization

Extracellular vesicles (EVs) are membrane vesicles formed by a lipid bilayer that are secreted by cells (Théry *et al*., 2009). They are found in body fluids and include exosomes, microvesicles and apoptotic bodies (György *et al*., 2011). Extracellular vesicles types can be differentiated by size, biosynthesis and contents. These membrane vesicles are released in the extracellular environment in response to specifics

[§]Correspondence authors: julianodasilveira@usp.br
Received: August 9, 2018
Accepted: October 3, 2018

Copyright © The Author(s). Published by CBRA. This is an Open Access article under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0 license)

stimulus in physiological or pathological situations (Cocucci *et al*., 2009; El Andaloussi *et al*., 2013; Tannetta *et al*., 2014). The collection and study of only one subtype of EVs is still a challenge due to the lack of specific markers and protocols for isolation (Gould and Raposo, 2013; Lötvall *et al*., 2014). Thus, it is recommended to use the term extracellular vesicles.

Exosomes are small EVs between 30-150 nm in diameter (György *et al*., 2011). Its biosynthesis involves the formation of multivesicular bodies (MVBs) from a first plasma membrane endocytosis, forming the early endosome. Intraluminal vesicles (ILV) are formed into MVB and are released in the extracellular environment after the fusion of MVB with the plasma membrane (Théry *et al*., 2002; 2009). This mechanism was described firstly during *in vitro* maturation of reticulocytes (Harding *et al*., 1983; Pan *et al*., 1985). Differently, microvesicles are large EVs between 100-1000 nm in diameter formed from plasma membrane blebbing in response to stimulus or stress (Cocucci *et al*., 2009; Tannetta *et al*., 2014). Apoptotic bodies are heterogeneous vesicles, from 1-5µm originated from apoptotic processes and contain organelles and nuclear fragments (Pavani *et al*., 2017). Curiously, new subpopulations of nanoparticles were described in a recent study (Zhang *et al*., 2018). They were termed small exosomes vesicles (60-80 nm), large exosomes vesicles (90-120nm) and exomeres (~35 nm) (Zhang *et al*., 2018). The study suggested distinct biological function for each subsets of nanoparticles, since its different biodistribution patterns (Zhang *et al*., 2018).

Despite the divergences in nomenclature between the subtypes of EVs, exosomes and microvesicles have important roles in biological processes and have been largely studied. Extracellular vesicles, such as exosomes and microvesicles, have bioactive material such as mRNA and microRNAs (Valadi *et al*., 2007), proteins (Simpson *et al*., 2008) and lipids (Subra *et al*., 2007). These components suggest their cell modulating functions. Additionally, the mechanism of communication between EVs and target cell include, briefly: 1) Interaction between membrane proteins activating intracellular signaling within target cells; 2) Cleavage of membrane exosomal proteins near to target cell receptors; 3) molecular transfer of EVs contents by fusion with target cell and 4) EVs phagocytosis by recipient cells (Mathivanan *et al*., 2010; El Andaloussi *et al*., 2013).

Extracellular vesicles can be obtained from extracellular fluids derived from culture media or body fluids (Lötvall *et al*., 2014). Several methods for isolation are in constant discussion. The ideal method can vary according to the question to be answered, application, purity and desired concentration (Witwer *et al*., 2013; Lötvall *et al*., 2014). The appropriated methods for EVs isolation and analysis are standardized by the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV). Usually, the techniques to isolate EVs are ultracentrifugation, filtration, polymer precipitation, immunoaffinity and microfluidic techniques (Witwer *et al*., 2013). The analysis of isolated products can be quantitative and qualitative. It can be realized by electronic and atomic force microscopy, optical particle tracking, flow cytometry and western blotting; to evaluate morphology, size, concentration, purity and protein content, respectively (Witwer *et al*., 2013).

Small extracellular vesicles in female reproduction

Since the observations of small EVs in intercellular communication, many studies have shown the influence of these vesicles in reproductive processes. In this context, small EVs were described in follicular fluid (da Silveira *et al*., 2012), oviductal fluid (Al-dossary *et al*., 2013), secreted by embryos in culture media (Kropp *et al*., 2014; Kropp and Khatib, 2015a; b) and in endometrium flushing (Ng *et al*., 2013). Additionally, the knowledge of molecular mechanisms implicating EVs is favoring the development of new technologies involving biological roles, diagnostic and therapeutic potential (Saadeldin *et al*., 2015).

Extracellular vesicles in ovarian follicle environment

The ovarian follicle is an important structure within the ovary. This microenvironment is composed by theca cells, granulosa cells, cumulus cells and the oocyte (reviewed by Knight and Glister, 2006). During the folliculogenesis, antral follicles are characterized by the presence of follicular fluid (reviewed by Edson *et al*., 2009). The follicle microenvironment is regulated by endocrine, paracrine and autocrine factors during its development (Albertini and Rider, 1994; Matsuda *et al*., 2012). Therefore, the intercellular communication within this microenvironment is essential for oocyte and follicle development. Additionally, follicular cells can secrete EVs, found in follicular fluid, which transmit information between cells (Andrade *et al*., 2017; Fig. 1-I).

Small EVs were firstly described in follicular fluid of mares (da Silveira *et al*., 2012). In this study, it was confirmed the small EVs uptake by granulosa cells *in vivo* and *in vitro*. In addition, different miRNAs were found in small EVs of young and old mares (da Silveira *et al*., 2012). Interestingly, different miRNAs contents were also observed in small EVs from follicular fluid of young and older women (Diez-Fraile *et al*., 2014). Sohel *et al*. (2013) described the proportion of miRNAs contents within different follicular fluid fractions. This group demonstrated for the first time that the majority of miRNAs from follicular fluid were in the exosomes fraction (Sohel *et al*., 2013), which emphasizes the importance of studying EVs miRNA contents. Furthermore, this study showed that exosome uptake by follicular cells was associated with an increase in miRNAs levels in these cells (Sohel *et al*., 2013).

Additionally, the communication mechanisms and effects of small EVs from follicular fluid, granulosa cells and COCs are under investigation. Exosomes from follicular fluid were involved in regulate TGF-beta (transforming growth factor beta) signaling pathway, an important pathway related to follicular development, in granulosa cells (da Silveira *et al*., 2014). This study showed that exosomes regulate members of TGF-beta

pathways such as ACVR1 (activin A receptor type 1) and ID2 (inhibitor of DNA binding 2) in granulosa cells *in vitro* by transferring mRNA, protein and miRNAs (da Silveira *et al*., 2014). Recent studies demonstrated that EVs from bovine follicular fluid from small follicles (3-5mm in diameter) and large follicles (>9mm in diameter) induce cumulus expansion during *in vitro* maturation (Hung *et al*., 2015). Importantly, this study demonstrated a better effect by EVs isolated from small follicles. Additionally, EVs from small follicles supplemented during COCs *in vitro* maturation induced changes in embryo transcripts levels, increase in blastocyst rates, as well as changes in global levels of DNA methylation and hydroxymethylation (da Silveira *et al*., 2017).

Other studies demonstrated that EVs characterization change according to follicle dimension (Navakanitworakul *et al*., 2016; Hung *et al*., 2017). Extracellular vesicles concentration and its miRNA contents are modified between small, medium and large bovine follicles (Navakanitworakul *et al*., 2016). Moreover, this study suggests changes in biogenesis or in EVs uptake during follicle development. This information was confirmed since the uptake of EVs from small follicles by granulosa cells was preferential, comparing to medium and large follicles EVs (Hung *et al*., 2017). The differences found between EVs from small and large follicles are related to increased granulosa cell proliferation after EVs supplementation from small antral follicles comparing to large follicles (Hung *et al*., 2017).

In summary, it is clear that EVs from follicular fluid have important contents related to biological processes during follicle and oocyte development. As an example, it is possible to detect effects from these EVs in cumulus and granulosa cells (Hung *et al*., 2015, 2017). These studies increased our understanding regarding reproductive biology processes as well as the possibility of using these EVs to improve oocyte *in vitro* maturation in many species. However, the follicle environment undergoes hormonal and developmental modifications that can change EVs biogenesis and contents, thus is important to consider ovarian follicle physiology in order to improve the use of EVs in the assisted reproductive techniques.

Extracellular vesicles in the oviduct environment

The oviduct is an important part of the female reproductive organ located between ovary and uterus (Hunter, 2012). After ovulation, the oocyte goes to the oviduct, where it undergoes fertilization and early embryo development in mammals (Spencer *et al*., 2007). The mammalian oviduct epithelium is composed by ciliated and secretory cells that are involved in these processes (Eriksen *et al*., 1994). These cells participate in secretion of oviductal fluid that has important roles in oocyte competence and embryo development (Leese *et al*., 2008; Avilés *et al*., 2010). Extracellular vesicles are one of the components of the oviductal fluid that favor oocyte and embryo quality (Lopera-vásquez *et al*., 2016; Fig. 1-II).

The presence of EVs in the oviductal fluid was described for the first time in murine and it was called "oviductosomes" (Al-dossary *et al*., 2013). Al-dossary *et al*. (2013) showed that murine oviductosomes contain a membrane protein called Plasma Membrane Ca2+ -ATPase 4 (PMCA4) that play roles in sperm capacitation, and subsequently in fertilization. Additionally, this study demonstrated *in vitro* the uptake of exosomal PMCA4 by sperm cells, suggesting an important role for these vesicles during fertilization.

In the beginnings of IVF different laboratories used oviductal cells in co-culture with embryos to mimic the beneficial effects of *in vivo* system (Eyestone and First, 1989). However, these techniques presented some disadvantages such as undefined culture conditions, embryo and somatic cells competition for nutrients as well as risk of diseases transmission (Orsi and Reischl, 2007). Thus, conditioned medium and EVs could serve as alternatives to co-culture components (Maillo *et al*., 2016). Moreover, the study of the EVs contents could lead to the use of specific donor cells or to the development of synthetic or semi synthetic vesicles to transport components of interest in order to mimic the maternal environment.

Proteomic profile of EVs secreted by bovine oviduct epithelial cells (BOEC) *in vivo* or *in vitro* presents important differences (Almiñana *et al*., 2017). *In vivo* collected EVs presented proteins related with fertilization and early pregnancy development, like oviductal glycoprotein (OVGP), heat shock protein A8 (HSPA8) and myosin 9 (MYH9). However, the BOECs submitted to *in vitro* system did not present OVGP (Almiñana *et al*., 2017), an important protein associated with zona pellucida maturation (Avilés *et al*., 2010). Therefore, these studies suggest that the *in vitro* system can affect oviductal EVs contents.

Extracellular vesicles supplementation to embryo culture media demonstrated functional effects in early embryo development (Lopera-vásquez *et al*., 2016; Almiñana *et al*., 2017). Additionally, it was demonstrated that *in vitro* produced embryos can internalize oviductal EVs (Almiñana *et al*., 2017; Pavani *et al*., 2017). Although, frozen collected oviductal EVs supplemented to *in vitro* culture media, improves *in vitro* blastocyst yield and quality in comparison with fresh oviductal EVs and negative control (without EVs; Almiñana *et al*., 2017). Similarly, EVs from BOEC were able to reproduce the beneficial effects of oviduct cells conditioned medium, suggesting its use as an alternative supplementation for embryo development culture media (Lopera-vásquez *et al*., 2016). Embryos treated with EVs from BOEC culture media presented greater number of total cells and better survival rate after vitrification in comparison with embryos cultured without EVs (Lopera-vásquez *et al*., 2016). Additionally, this study demonstrated a greatest relative expression of *PAG1* (Phosphoprotein Membrane Anchor with Glycosphingolipid Microdomains 1), an implantation related gene, in embryos supplemented with EVs. Specifically, oviductal fluid derived EVs from isthmus resulted in greatest bovine embryo survival rate after vitrification

comparing with EVs from ampulla or in absence of EVs (Lopera-Vasquez *et al*., 2017). The improvement in embryo quality can be associated to the level of *AQP3* (Aquaporin 3), a water channel, that was upregulated in embryos supplemented with EVs from isthmus comparing with embryos supplemented with FCS only (Lopera-Vasquez *et al*., 2017).

In conclusion, oviductal derived EVs have a role during embryo early development. This communication can favor fertilization and embryo quality. Then, EVs from oviduct are possible tools to improve *in vitro* culture system. However, it is important to consider the physiological modifications in EVs contents according to oviduct origin *in vivo* or *in vitro* as well as the region of oviduct used to obtain these EVs. These concerns are important to understand the role of these EVs during biological processes such as fertilization and early embryo development aiming to use these EVs properly in different ARTs.

Extracellular vesicles in embryo in vitro production

Embryos produced *in vitro* are exposed to different conditions in comparison with the *in vivo* oviductal and uterine environment. These *in vitro* conditions are responsible for many embryonic alterations, including morphological, metabolic, developmental and molecular changes (Plante and King, 1994; Holm and Callesen, 1998; Lonergan *et al*., 2003). Based on that, is important to investigate *in vitro* embryo derived EVs in order to understand the consequences of the *in vitro* environment. The first evidence of embryo derived EVs was demonstrated by the co-culture of porcine parthenogenetic (PA) and somatic cell nuclear transference (SCNT) embryos (Saadeldin *et al*., 2014). Pluripotency transcripts such as octamer-binding transcription factor (*OCT4*), sex determining region Y-box 2 (*SOX2)*, avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (*C-MYC)* and homeobox transcription factor nanog (*NANOG*) were present in exosomes secreted by porcine PA embryos, suggesting that co-culture of embryos could create a microenvironment, thus improving SCNT embryo development (Saadeldin *et al*., 2014).

Moreover, SCNT embryos also secrete exosomes in the medium during *in vitro* culture. Supplementation with exosomes secreted by SCNT embryos in the culture medium of SCNT embryos increases blastocyst rate, total cell numbers, ratio of ICM/TE as well as transcripts levels of *OCT-4* in comparison to SCNT embryos without supplementation (Qu *et al*., 2017). These findings indicated that exosomes present in the culture medium are essential for embryo development and changes caused during embryo development by culture medium replacement may be repaired by exosome supplementation (Qu *et al*., 2017). Thus, *in vitro* embryo derived EVs may modulate *in vitro* conditions creating a microenvironment that favors embryonic development. Additionally, embryo derived EVs could serve as non-invasive marker correlated with embryo quality.

Extracellular vesicles in endometrial-conceptus cross-talk

Since early pregnancy stages, the establishment of cross communication between embryo/conceptus and the maternal organism is necessary. The endometrium is formed by epithelial and glandular cells capable to secrete nutrients and growth factors essential for early embryonic development (Bazer *et al*., 2011). Additionally, in ruminants, conceptus secreted interferon-tau (IFNT) is a protein responsible for signaling conceptus presence inside the maternal uterus during maternal recognition of pregnancy (Farin *et al*., 1990).

Extracellular vesicles are part of this cross communication important for maternal recognition of pregnancy (Tannetta *et al*., 2014). During pre-implantation period conceptus and maternal endometrium can secrete EVs (Saadeldin *et al*., 2015; Fig. 1- III). In order to test that, on day 14 of pregnancy, uterine flush (UF) derived EVs were labeled with PKH67 and infused back in the pregnant uterus. Upon collection of tissues, conceptus trophoblast and uterine epithelia contained labeled EVs, suggesting the role of EVs in the cross communication between those cells at the onset of pregnancy (Burns *et al*., 2016). Similarly, uterine epithelial cells can secrete EVs containing ovine endogenous jaagsiekte retroviruses (*enJSRV*) mRNA (Ruiz-González *et al*., 2015). Free and exosomal enJSRV act via toll-like receptors (*TLR*) on the conceptus trophectoderm cells (oTr1) to induce interferon-tau (IFNT) secretion (Ruiz-González *et al*., 2015). Trophoblast CT-1 cells treated with exosomes from uterine flushing of pregnant cows on Days 17, 20 and 22 did not change *IFNT* and caudal type homeobox 2 (*CDX2*) transcripts levels, suggesting an influence of the pregnancy period on the components of the EVs (Kusama *et al*., 2018).

Moreover, ovine conceptus trophectoderm derived exosomes, with 15 and 17 days of pregnancy, have IFNT, macrophage-capping protein (CAPG) as well as aldo-keto reductase family 1, member B1 protein (AKR1B1) (Nakamura *et al*., 2016). Similarly, exosomes secreted by ovine and bovine conceptus containing IFNT were able to increase interferon-stimulated genes (ISGs) mRNA expression in primary uterine endometrial epithelial cells (EECs) (Nakamura *et al*., 2016; Kusama *et al*., 2018). Endometrial epithelial cells treated with exosomes at pre-implantation period (P17 UFs) increased the expression of apoptosis – related genes such as BCL2 associated X, apoptosis regulator (*BAX)*, caspase 3 (*CASP3)*, tumor necrosis factor (*TNFA*) and tumor protein P53 (*TP53*) transcripts (Kusama *et al*., 2018). Besides that, exosomes at post-implantation (P20 and P22 UFs) stimulate adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule 1 (*VCAM1*) mRNA (Kusama *et al*., 2018). These results demonstrate that changes in the uterine environment mediated by exosomes are required for attachment and development of the conceptus.

Progesterone and estradiol hormone can influence the secretion of exosomes by endometrial

cells in human (Greening *et al*., 2016). Progesterone is needed for elongation and survival of ovine conceptus (Spencer and Bazer, 2002). Thus, EVs number increases from Day 10 to 14 post-estrus in the ovine uterine lumen (Burns *et al*., 2018). Moreover, progesterone treatment increased the EVs number in the uterine lumen in comparison with a P4 receptor antagonist group (Burns *et al*., 2018). MiRNAs upregulated by progesterone in ovine uterine EVs are predicted to modulate pathways such as PI3K/AKT, bone morphogenetic proteins (*BMP*) and post-transcriptional silencing by small RNAs (Burns *et al*., 2018). These findings indicate a new way by which P4 may modulate endometrial function controlling conceptus growth during pregnancy establishment.

On Day 20 of pregnancy, EVs were identified in the porcine endometrium and chorioallantoic membrane (Bidarimath *et al*., 2017). Porcine trophectoderm derived EVs induce aortic endothelial cells proliferation, which may be stimulating angiogenesis (Bidarimath *et al*., 2017). Furthermore, porcine trophectoderm and aortic endothelial cells EVs have miRNAs predicted to modulate angiogenesis and placental development pathways, suggesting that these EVs may play an important role in the communication between conceptus and maternal endometrium influencing the establishment of pregnancy (Bidarimath *et al*., 2017).

Therefore, factors such as hormones and the day of pregnancy can change EVs secretion and contents in the uterine environment. Based on that, is important to understand the mechanisms modulating uterine EVs, which can impact protein, mRNA and miRNAs contents involved in important biological processes during early pregnancy in the different domestic species. Finally, uterine EVs may play important role in endometrial-conceptus cross-talk in the period of maternal recognition of pregnancy and might be involved in pregnancy success.

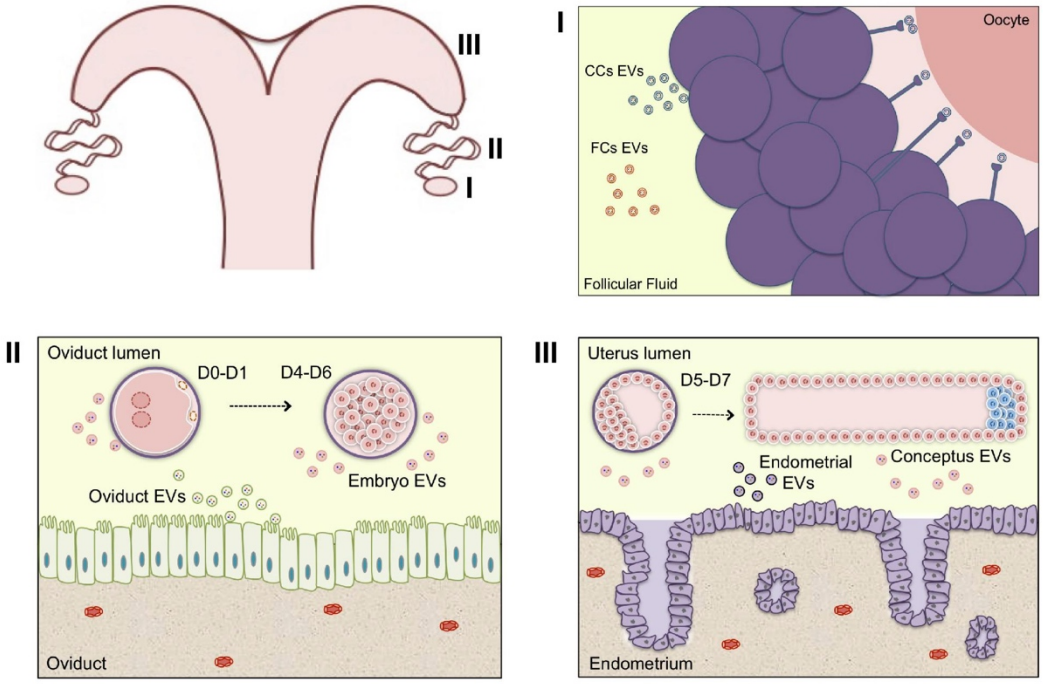


Figure 1. Extracellular vesicles in female reproduction. Schematic representation of extracellular vesicles present within the ovarian follicular microenvironment, as well as during the embryonic development within the oviduct and uterus. (I) Extracellular vesicles in the follicular fluid can carry and transfer bioactive molecules such as proteins, RNAs, miRNAs, lipids and metabolites contributing to oocyte maturation process, (II) to fertilization and embryonic early development in the oviductal microenvironment (III) as well as during the maternal recognition within the uterine microenvironment. Legend: EVs – extracellular vesicles; CCs – cumulus cells; FCs – follicular cells; D0 – fertilization day.)

Perspectives

Since the discoveries of EVs biological functions, many studies have been conducted exploring their biosynthesis, contents, interaction with recipient cells as well as methods for isolation and characterization. Thus, is important to clarify the involvement of EVs in physiology and pathological processes. Additionally, EVs have potential as new biomarkers and therapeutics. Different studies are

exploring the inhibition of EVs formation, release and uptake by recipient cells, as well as their potential in therapeutic (El Andaloussi *et al*., 2013). However, we still have challenges on these subjects. Despite the challenges, the development of synthetic and semi-synthetic vesicles might be the mechanism to use these EVs *in vivo* and *in vitro*. Extracellular vesicles are considered a new biological strategy to reach cells and deliver nucleic acids with increased specificity (Nguyen and Szoka, 2012). Despite the good perspectives for the clinical application of EVs, the success depends on EVs time of processing, the small volumes of fluids, the knowledge regarding EVs trafficking and functions on the *in vivo* environment (Hood and Wickline, 2012).

In the reproduction scenario, synthetic or semi-synthetic EVs are yet to be developed. However, since their description in reproductive fluids, many researches have demonstrated cross communication involving EVs as well as the contents such as miRNAs, mRNAs and proteins in different reproductive biofluids. Therefore, is important to increase our knowledge regarding the EVs biology in reproductive tissues in order to generate new approaches to improve fertility. The goal will be to create a better environment to produce embryos *in vitro* and consequently generate healthier pregnancies in animals and humans.

Acknowledgments

The authors are thankful to the University of São Paulo; the São Paulo Research Foundation – FAPESP (grant number #2014/22887-0 (JCS), #2017/02037-0 (ACFCMA) and #2018/01431-9 (GMA)); the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (grant number #306349/2017-5 (FP)) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

Al-dossary AA, Strehler EE, Martin-deleon PA. 2013. Expression and secretion of plasma membrane Ca 2 + - ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: Association with Oviductal Exosomes and Uptake in Sperm. *PLoS ONE*, 8:e80181. doi: 10.1371/journal.pone.0080181. eCollection 2013.

Albertini DF, Rider V. 1994. Patterns of intercellular connectivity in the mammalian cumulus-oocyte complex. *Microsc Res Tech*, 133:125-133.

Almiñana C, Corbin E, Tsikis G, Alcântara-Neto AS, Labas V, Reynaud K, Galio L, Uzbekov R, Garanina AS, Duart X, Mermillod P, 2017. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction*, 154:153-168.

Andrade G, Meirelles F, Perecin F, da Silveira J. 2017. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. *Reprod Domest Anim,* 52:1036-1045.

Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. 2010. Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod*, 16:896-906.

Bazer FW, Wu G, Johnson GA, Kim J, Song G. 2011. Uterine histotroph and conceptus development: select nutrients and secreted phosphoprotein 1 affect mechanistic target of rapamycin cell signaling in ewes. *Biol Reprod*, 85:1094-1107.

Bidarimath M, Khalaj K, Kridli RT, Kan FWK, Koti M, Tayade C. 2017. Extracellular vesicle mediated intercellular communication at the porcine maternal-fetal interface: A new paradigm for conceptus-endometrial cross-talk. *Sci Rep*, 7:40476.

Bouillon C, Léandri R, Desch L, Ernst A, Bruno C. 2016. Does embryo culture medium influence the health and development of children born after in vitro fertilization? *PLoS ONE*, 11:e0150857. doi: 10.1371/journal.pone.0150857. eCollection 2016.

Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. 1999. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51:59-70.

Burns GW, Brooks KE, Spencer TE. 2016. Extracellular vesicles originate from the conceptus and uterus during early pregnancy in sheep. *Biol Reprod*, 56:1-11. doi: 10.1095/biolreprod.115.134973.

Burns GW, Brooks KE, O'Neil EV, Hagen DE, Behura SK, Spencer TE. 2018. Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. *Biol Reprod*, 98:612-622.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19:43-51.

da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. 2012. 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*, 86:71. doi: 10.1095/biolreprod.111.093252.

da Silveira JC, Carnevale EM, Winger QA, Bouma GJ. 2014. Regulation of ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare. *Reprod Biol Endocrinol*, 12:44. doi: 10.1186/1477-7827-12-44.

da Silveira JC, Andrade GM, Collado M, Sampaio RV, Pinaffi VLF, Jardim IB, Sangalli, JR, Silva LA, Cesar C, Nogueira MFG, Cesar ASM, Coutinho LL. 2017. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS ONE*, 12:e0179451. doi: 10.1371/journal.pone.0179451. eCollection 2017.

Diez-Fraile A, Lammens T, Tilleman K, Witkowski W, Verhasselt B, De Sutter P, Benoit Y, Espeel M, D'Herde K. 2014. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization. *Hum Fertil*, 17:90-98.

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*, 30:624-712.

El Andaloussi S, Manger I, Breakefield XO, Wood MJA. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug*

Discov, 12:347-357.

Eriksen T, Terkelsen O, Hyttel P, Greve T. 1994. Anatomy and Embryology ultrastructural features of secretory cells in the bovine oviduct epithelium. *Anat Embryol*, 190:583-590.

Eyestone WH, First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *Reproduction*, 85:715-720.

Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM. 1990. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biol Reprod*, 43:210-218.

Gould SJ, Raposo G. 2013. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles,* 2:20389. doi: 10.3402/jev.v2i0. 20389. eCollection 2013.

Greening DW, Nguyen HPT, Elgass K, Simpson RJ, Salamonsen LA. 2016. Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions. *Biol Reprod*, 94:38. doi: 10.1095/biolreprod.115.134890.

György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A, Buzás, EI. 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68:2667-2688.

Harding C, Heuser J, Stahl P, Harding C, Heuser J, Stahl P. 1983. Receptor-Mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*, 97:329-339.

Holm P, Callesen H. 1998. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev*, 38:579-594.

Hood JL, Wickline SA. 2012. A systematic approach to exosome-based translational nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 4:458-467.

Hung WT, Hong X, Christenson LK, McGinnis LK. 2015. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biolo Reprod*, 93:117.

Hung W, Navakanitworakul R, Kha, T, Zhang P, Davis JS, Mcginnis LK, Christenson LK. 2017. Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. *Biol Reprod,* 97:644-655.

Hunter RHF. 2012. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 87:244-255.

Knight PG, Glister C. 2006. TGF-beta superfamily superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132:191-206.

Kretser DM De, Hedger MP, Loveland KL, Phillips DJ. 2002. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update*, 8:529-541.

Kropp J, Salih SM, Khatib H. 2014. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Front Genet*, 5:91. doi: 10.3389/fgene.2014.00091. eCollection 2014.

Kropp J, Khatib H. 2015a. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J Dairy Sci*, 98:6552-6563.

Kropp J. **Khatib H**. 2015b. mRNA fragments in in vitro culture media are associated with bovine preimplantation embryonic development. *Front Genet*, 6:273. doi: 10.3389/fgene.2015.00273. eCollection 2015.

Kusama K, Nakamura K, Bai R, Nagaoka K, Sakurai T, Imakawa K. 2018. Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochem Biophys Res Commun*, 495:1370-1375.

Leese HJ, Hugentobler SA, Gray SM, Morris DG, Sturmey RG, Whitear SL, Sreenan JM. 2008. Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Devt*, 20:1-8.

Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. 2003. 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*, 69:1424-1431.

Lopera-vásquez R, Hamdi M, Fernandez-fuertes B, Maillo V. 2016. Extracellular vesicles from BOEC in in vitro embryo development and quality. *PLoS ONE*, 11:e0148083. doi: 10.1371/journal.pone.0148083. eCollection 2016.

Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillo V, Gutierrez-Adan A, Bermejo-Alvarez P, Angel Ramirez M, Yanez-Mo M, Rizos D. 2017. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction*, 153:461-470.

Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C .2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913. eCollection 2014.

Maillo V, Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. 2016. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, 86:443-450.

Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 73:1907-1920.

Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*, 58:44-50.

Mellisho EA, Vela AE, Cueto A, Fader C, Castro FO, Rodrıguez-Alvarez L. 2017. Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. *PLoS ONE*, 12:e0178306. doi: 10.1371/journal.pone.0178306. eCollection 2017.

Nakamura K, Kusama K, Bai R, Sakurai T, Isuzugawa K, Godkin JD, Suda Y, Imakawa K. 2016. Induction of IFNT-Stimulated genes by conceptus-derived exosomes during the attachment

period. *PLoS ONE*, 11:e0158278. doi: 10.1371/journal.pone.0158278. eCollection 2016.

Navakanitworakul R, Hung WT, Gunewardena S, Davis JS, Chotigeat W, Christenson LK. 2016. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. *Sci Rep*, 6:25486. doi: 10.1038/srep25486.

Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA. 2013. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS ONE*, 8:e58502. doi: 10.1371/journal.pone.0058502.

Nguyen J, Szoka FC. 2012. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? *Acc Chem Res*, 45:1153-1162.

Orsi NM, Reischl JB. 2007. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*, 67:441-458.

Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*, 101:942-948.

Pavani KC, Alminana C, Wydooghe E, Mermillod P, Catteeuw M, Ramírez MA, Rizos D, Soom A Van. 2017. Emerging role of extracellular vesicles in communication of preimplantation embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 29:66-83.

Plante L, King WA. 1994. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in Vitro and in Vivo fertilization. *J Assist Reprod Genet*, 11:515-529.

Qu P, Qing S, Liu R, Qin H, Wang W, Qiao F, Ge H, Liu J, Zhang Y, Cui W, Wang Y. 2017. Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. *PLOS ONE*, 12:e0174535. doi: 10.1371/journal.pone.0174535. eCollection 2017.

Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200:373-383.

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. 2002a. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev*, 62:320-327.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002b. 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*, 61:234-248.

Ruiz-González I, Xu J, Wang X, Burghardt RC, Dunlap KA, Bazer FW. 2015. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes. *Reproduction*, 149:281-291.

Saadeldin IM, Kim SJ, Choi YB, Lee BC. 2014. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cell Reprogram*, 16:223-234.

Saadeldin IM, Oh HJ, Lee BC. 2015. Embryonic - maternal cross-talk via exosomes: potential implications. *Stem Cells Cloning*, 8:103-107.

Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. 2008. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics*, 8:4083-4099.

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

Sohel MMH, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, Rings F, Uddin MJ, Spencer TE, Schellander K, Tesfaye D. 2013. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS ONE*, 8:e78505. doi: 10.1371/journal.pone.0078505. eCollection 2013.

Spencer TE, Bazer FW. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci*, 7:d1879-1898.

Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89:205-212.

Tannetta D, Dragovic R, Alyahyaei Z, Southcombe J. 2014. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell Mol Immunol*, 11:548-563.

Théry C, Ostrowski M, Segura E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9:581-593.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2:569-579.

Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. 2014. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics*, 9:803-815.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall, JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9:654-659.

Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2:1-25. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360. eCollection 2013.

Zhang H, Freitas D, Kim HS, Fabijanic K, Li Z, Chen H, Mark MT, Molina H, Martin AB, Bojmar L, Fang J, Rampersaud S, Hoshino A, Matei I, Kenific CM, Nakajima M, Mutvei AP, Sansone P, Buehring W, Wang H, Jimenez JP, Cohen-gould L, Paknejad N, Brendel M, Manova-todorova K, Cubillos-ruiz JR, Galletti G, Giannakakou P, Cuervo AM. 2018. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol*, 20:332-343.

Apêndice I – Carta de aceite e resumo de artigo recém-publicado na revista Biology of Reproduction.
Data de publicação: 02/09/2019.
DOI: https://doi.org/10.1093/biolre/ioz177

Ana Clara Faquineli Cavalcante Mendes de Avila <anaclaramavila@usp.br>

Fwd: Biology of Reproduction: Decision on BIOLRE-2019-0149R1

4 mensagens

Juliano Coelho da Silveira <julianodasilveira@usp.br> 7 de agosto de 2019 18:35
Para: anaclaramavila@usp.br

Sent from my iPhone

Begin forwarded message:

From: "Biology of Reproduction" <em@editorialmanager.com>
Date: 7 August 2019 17:31:35 GMT-3
To: "Juliano da Silveira" <julianodasilveira@usp.br>
Subject: Biology of Reproduction: Decision on BIOLRE-2019-0149R1
Reply-To: "Biology of Reproduction" <biolre.editorialoffice@oup.com>

Re: BIOLRE-2019-0149R1 - Estrous cycle impacts miRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation

Dear Dr. da Silveira,

Congratulations! We are pleased to accept your manuscript for publication. The PDF version of the article will be published first in Advance Articles, which establishes its date of publication. Subsequently, your paper will be published in traditional form in the online version of Biology of Reproduction and be available in PDF format for traditional print.

If the research reported in this paper was funded entirely or in part by the U.S. National Institutes of Health (NIH) or an agency that requires public archiving and access and accepts deposit in PubMed Central (PMC) or PMC International, BOR will deposit the final, published manuscript in PMC in compliance with the NIH Enhanced Public Access Policy, and you need do nothing further. You will receive your official acceptance date from Oxford University Press once you have signed your license to publish. (N.B. If you are a UK-based author and are looking to comply with the HEFCE policy on open access in the Research Excellence Framework, you should use the official acceptance date when depositing in your repository.)

Also, beginning 12 months after the date of final publication, all articles published in Biology of Reproduction will be covered by a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC). Authors whose funding agency requires access earlier than the 12-month embargo must choose an open-access option. Upon final publication, Open Access articles will be publicly available on the journal site and, if required, deposited to PMC/I with a 6 month embargo and published with CC BY-NC license in accordance with funding agency policy. Articles may be shared or adapted--provided that the original source is credited and changes are indicated. Under the CC BY-NC license, articles and material therein cannot be used for commercial purposes.

Please note authors of accepted article will need to submit authorship confirmation. Each author will receive an email verifying authorship of the final manuscript that they will need to complete. Once we have received all confirmation from the co-authors, your article will be sent to production. To prevent any delay in publication of your article, please ensure each author has submitted their authorship confirmation. If you have any questions, please contact us at biolre.editorialoffice@oup.com

If your manuscript is accepted you will not be able to make any changes to the authors, or order of

Format: Abstract

Full text links

OXFORD ACADEMIC

Biol Reprod. 2019 Sep 2. pii: ioz177. doi: 10.1093/biolre/ioz177. [Epub ahead of print]

Estrous cycle impacts miRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation.

de Ávila ACFCM[1], Bridi A[1], Andrade GM[1], Del Collado M[1], Sangalli JR[1], Nociti RP[1], da Silva Junior WA[2], Bastien A[3], Robert C[3], Meirelles FV[1], Perecin F[1], da Silveira JC[4,1].

Author information

1 Veterinary Medicine Department, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of Sao Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil.

2 Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

3 Animal Science department, Research Center in Reproductive Biology, Institute on Nutrition and Functional Foods, Laval University, Québec, Québec, Canada.

4 Department of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil.

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are nanoparticles secreted by ovarian follicle cells. EVs are an important form of intercellular communication, since they carry bioactive contents, such as microRNAs, mRNAs, and proteins. MicroRNAs are small non-coding RNA capable of modulating mRNA translation. Thus, EVs can play a role in follicle and oocyte development. However, it is not clear if EV contents vary with the estrous cycle stage. The aim of this study was to investigate the bovine microRNA content in EVs obtained from follicles at different estrous cycle stages, which are associated with different progesterone (P4) levels in the **follicular fluid** (FF). We collected FF from 3-6 mm follicles and evaluated the microRNA profile of the EVs and their effects on cumulus-oocyte complexes (COCs) during in vitro maturation (IVM). We observed that EVs from low P4 group have a higher abundance of microRNAs predicted to modulate pathways, such as MAPK, RNA transport, Hippo, Cell cycle, FoxO, oocyte meiosis, and TGF-beta. Additionally, EVs were taken up by cumulus cells, and, thus, affected the RNA global profile 9 h after EV supplementation. Cumulus cells supplemented with EVs from low P4 presented up-regulated genes that could modulate biological processes, such as oocyte development, immune responses, and Notch signaling compared to genes of cumulus cells in the EV free media or with EVs from high P4 follicles. In conclusion, our results demonstrate that EV microRNA contents are distinct in follicles exposed to different estrous cycle stage. Supplementation with EVs impacts gene expression and biological processes in cumulus cells.

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of Society for the Study of Reproduction.

KEYWORDS: cumulus cells; follicle; microRNA; oocyte maturation; progesterone