

RESUMO

DE LIMA, M. A. **Níveis transcricionais no ambiente folicular ovariano de fêmeas *Bos indicus* com alta e baixa contagem de folículos antrais**

2019. 49p. Monografia (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A contagem de folículos antrais (CFA) tem sido associada a performance reprodutiva em bovinos. Em fêmeas taurinas, a maior CFA é associada positivamente a taxas de gestação e a melhor produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. Contrariamente, a CFA em fêmeas indicinas apresenta correlação negativa com as taxas de gestação após transferência de embriões produzidos *in vitro* ou inseminação artificial em tempo fixo. Os aspectos biológicos que intermediam a relação da CFA com a reprodução ainda são desconhecidos. Sabe-se que o desenvolvimento folicular pode ser regulado tanto por fatores moleculares quanto hormonais. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão gênica nos oócitos e nas células do cumulus (CC), bem como avaliar os níveis séricos de estradiol de fêmeas de baixa CFA (B-CFA) e alta CFA (A-CFA) utilizando novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) como modelo experimental. Novilhas Nelore (n=48) tiveram a onda folicular ovariana sincronizada. No dia 5, a CFA foi realizada e os 10 animais com menor e os 10 com maior CFA foram selecionados para formar respectivamente os grupos de B-CFA (número de folículos <30, AFC = 24 ± 4.73) e A-CFA (número de folículos >60, AFC = 72.3 ± 15.67). Ainda no dia 5, amostras de sangue foram coletadas e os complexos cumulus-oócito foram recuperados por aspiração folicular. As CC e os oócitos foram separados por pipetagens consecutivas. Vinte amostras (pools) de 10 oócitos (1 por animal) e 20 amostras (pools) das CC dos respectivos oócitos (1 por animal) foram usadas para extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação da expressão de 95 genes por PCRq-TR. As médias de expressão gênica normalizadas, usando o *PPIA* como gene de referência, foram comparadas pelo teste T de Student, sendo consideradas significantes quando $P < 0,05$. Nos oócitos, 11 genes foram expressos diferencialmente, incluindo 8 com expressão aumentada (*BMP15*, *HAS2*, *EGFR*, *NPR3*, *H1FOO*, *IGFBP2*, *GAPDH* e *HSF1*) e 3 com expressão diminuída (*TFAM*, *PRDX3* e *XBP1*) no grupo de B-CFA, comparado ao grupo de A-CFA. Coletivamente,

estes genes são relacionados a comunicação intercelular, controle meiótico, modulação epigenética, recrutamento folicular, manutenção, estresse e respostas celulares ao estresse. Nas CC, um total de 27 genes foi diferencialmente expresso entre os grupos. As CC dos animais de B-CFA tiveram expressão elevada de genes associados ao controle meiótico (*RGS2*, *NPR3* e *NPR2*) e modulação epigenética (*DNMT3A*, *HDAC2* e *PAF1*), bem como de genes associados a funções como comunicação intercelular, divisão, respostas ao estresse, entre outras (*EGFR*, *CDK6*, *PA2G4*, *IGF1R*, *GSK3A*, *ATPL5*, *TFAM*, *PFKP*, *CASP9*, *STAT3*, *XBP1*, *HSP90AA1*, *HSPA5*, *HSPD1* e *SOD1*). Contrariamente, *FSHR*, *ARO*, *PTGS2*, *GAPDH*, *SREBF1* e *NFKB2* estavam com expressão diminuída em B-CFA comparado ao grupo A-CFA. Estes resultados indicam que compartimentos foliculares distintos possuem diferentes padrões transcricionais em fêmeas de B-CFA e A-CFA. Além disto, os animais de B-CFA apresentam maiores quantidades de estradiol circulante do que os animais de A-CFA. Apesar deste trabalho não possibilitar um estabelecimento de relação de causa-consequência, tanto os padrões transcricionais quanto de estradiol possivelmente estão associados a performances reprodutivas relatadas na literatura.

Palavras-chave: Contagem de folículos antrais, folículo ovariano, *Bos indicus*, oócito, células do cumulus.

ABSTRACT

DE LIMA, M. A. **Transcriptional patterns within ovarian follicular microenvironment of *Bos indicus* females with high and low antral follicular count**: 2019. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Antral Follicle Count (AFC) has been associated with reproductive performance in cattle. In taurine females, higher AFC is positively associated with pregnancy rates and greater *in vivo* and *in vitro* embryo production. Contrarily, in indicine females, AFC is negatively correlated with pregnancy rates after IVP-ET or TFAI. The biological aspects that mediate the relationship between CFA and reproduction remain unknown. Follicular development is known to be regulated by both molecular and hormonal factors. This study aimed to investigate gene expression in oocytes and cumulus cells as well to evaluate serum estradiol levels of low AFC (L-AFC) and high AFC (H-AFC) females using Nellore heifers (*Bos taurus indicus*) as experimental model. Nellore heifers (n=48) had the ovarian follicular wave synchronized. On Day 5, AFC was determined and the bottom 10 and top 10 females were assigned to experimental groups LAFC (number of follicles < 30, AFC = 24 ± 4.73) and HAFC (number of follicles > 60, AFC = 72.3 ± 15.67), respectively. Still on day 5, blood samples were collected, and cumulus-oocyte complexes were retrieved by ovum pick-up. Cumulus cells and oocytes were separated by pipetting. Twenty samples (polls) of 10 oocytes (one per animal) and 20 samples (polls) of cumulus cells from respective oocytes (one per animal) were used for RNA extraction, cDNA synthesis and gene expression assessment of 95 genes by RT-qPCR. Means of normalized gene expression, using *PPIA* as the reference gene, were compared by Student's t-test and were considered significant when $P < 0.05$. In oocytes, a total of 11 genes were differentially expressed, including 8 upregulated in L-AFC group (*BMP15*, *HAS2*, *EGFR*, *NPR3*, *H1FOO*, *IGFBP2*, *GAPDH* and *HSF1*) and 3 downregulated in L-AFC (*TFAM*, *PRDX3* and *XBP1*) compared with H-AFC. Collectively, these genes are related to cellular communication, meiotic control, epigenetic modulation, follicular recruitment, maintenance, stress and cellular responses to stress. In cumulus cells a total of 27 genes were differentially expressed between the groups. Cumulus cells from L-AFC animals had higher expression of genes associated with meiotic control (*RGS2*, *NPR3* and *NPR2*) and epigenetic modulation (*DNMT3A*, *HDAC2* e *PAF1*), as well as genes

associated with functions as intercellular communication, division, cellular responses to stress and others (*EGFR*, *CDK6*, *PA2G4*, *IGF1R*, *GSK3A*, *ATPL5*, *TFAM*, *PFKP*, *CASP9*, *STAT3*, *XBP1*, *HSP90AA1*, *HSPA5*, *HSPD1* e *SOD1*). Contrarily *FSHR*, *ARO*, *PTGS2*, *GAPDH*, *SREBF1* e *NFKB2* were downregulated in LAFC compared with HAFC group. These results indicate that distinct cellular compartments within ovarian follicles have dissimilar transcriptional patterns comparing LAFC and HAFC females. In addition, B-CFA animals had higher circulating estradiol than A-CFA animals. Although this work does not allow establishing a cause-consequence relationship, both transcriptional and estradiol patterns are possibly associated with reproductive performances reported in the literature.

Keywords: Antral Follicle Count, *Bos indicus*, ovarian follicle, oocyte, cumulus cells