

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HELENA FABIANA REIS DE ALMEIDA SARAIVA

**Estudo sobre os efeitos de diferentes sistemas de maturação *in vitro*
na progressão meiótica, expressão gênica e comunicação em
complexos *cumulus*-oócitos bovinos**

Pirassununga

2023

HELENA FABIANA REIS DE ALMEIDA SARAIVA

**Estudo sobre os efeitos de diferentes sistemas de maturação *in vitro*
na progressão meiótica, expressão gênica e comunicação em
complexos *cumulus*-oócitos bovinos**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin

Coorientadora: Dra. Clara Slade Oliveira

Pirassununga

2023

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

S243e Saraiva, Helena Fabiana Reis de Almeida
Estudo sobre os efeitos de diferentes sistemas
de maturação in vitro na progressão meiótica,
expressão gênica e comunicação em complexos cumulus-
oócito / Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva ;
orientador Felipe Perecin ; coorientador Clara
Slade Oliveira. -- Pirassununga, 2023.
120 f.

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

1. complexo cumulus-oócito, . 2. maturação in
vitro. 3. projeções transzonais. 4. pré-maturação. 5.
vesícula germinativa. I. Perecin, Felipe, orient.
II. Oliveira, Clara Slade, coorient. III. Título.

HELENA FABIANA REIS DE ALMEIDA SARAIVA

Estudo sobre os efeitos de diferentes sistemas de maturação *in vitro* na progressão meiótica, expressão gênica e comunicação em complexos *cumulus*-oócitos bovinos

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

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe Percin

Coorientadora: Dra. Clara Slade Oliveira

Data da aprovação: 24 de agosto de 2023

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cláudia Lima Verde Leal

Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingotti

Instituição: Universidade Estadual Paulista

Dra. Maite Del Collado Barrondo

Instituição: *Science Creating Lives*

Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Instituição: Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Instituição: Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à Santíssima Trindade
Pai de Amor, Filho Salvador, Espírito Consolador
Em Seu altar consagrei este trabalho, assim como minha vida
Hoje, louvo-Te por ter me sustentado até aqui.

“Combati o bom combate, completei a carreira, guardei a fé”
(2ª Carta a Timóteo, capítulo 4, versículo 7)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço meu orientador, Prof. Dr. Felipe Perecin, por ter me dado a chance de retornar à equipe LMMD depois da minha recuperação. Por todas as vezes em que eu falava “preciso desse anticorpo” ou “vamos fazer isso” e ele respondia “manda bala!”. Agradeço a orientação, os puxões de orelha, e por me dar a chance de provar o meu trabalho. Devo tudo o que realizei a essa oportunidade que tive. Cresci demais, principalmente nessa reta final, tanto científica quanto pessoalmente, e devo parte disso a todo apoio que recebi. Muito obrigada, Felipe, por ter me aceitado em sua equipe.

Agradeço à minha coorientadora, que no Treinamento Técnico na Embrapa Gado de Leite me deu a chance de conhecer o mundo incrível da produção *in vitro* de embriões, e que me abriu portas sem as quais eu jamais teria chegado aqui. Muito obrigada, Dra. Clara Slade Oliveira. Jamais esquecerei o que você fez por mim.

Também agradeço, de uma forma especial, ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles. Com sua genialidade e sensibilidade ímpares, contribuiu de forma valiosa não só para com este trabalho, mas também me inspirou a ser uma profissional mais humana. Foram de alguns minutos de conversa durante um cafezinho que nasceram ideias fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada por sua mente brilhante e por sua ajuda, que colaborou tanto para que eu colhesse este fruto hoje.

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira por todos os papos científicos, pelas contribuições a este trabalho durante as reuniões do laboratório. Admiro e compartilho de sua forma de pensar “fora da caixa”. Obrigada por toda colaboração durante esses anos todos.

Também me sinto grata pelas amizades que construí nesse lugar, umas mais antigas, outras mais recentes. Agradeço à velha guarda, Gabi Andrade, Marininha, à minha companheira de coletas noturnas, carros pifados e *playlists* de excelente bom gosto Luana Alves, à fofa Maíra Bianchi, e à nova safra de queridas, as “Perecats” Letícia, Ana Beatriz, e especialmente à Bruna, que nessa reta final me ajudou de forma preciosa. A chegada de vocês tornou tudo mais leve.

Agradeço de uma forma especial à basquinha Maite del Collado, que me ajudou antes do meu trancamento de matrícula para recuperação da saúde, pela paciência, por ter me ajudado no retorno, por ter cedido as amostras que foram o pontapé inicial da história que conto nesse trabalho, e por me inspirar diariamente (ainda que ela não saiba disso) a ser uma cientista melhor, todas as vezes que eu a vejo brilhando nas redes sociais. Basca, você é luz.

Agradeço a todos os colegas do LMMD pela convivência durante esses anos. Um agradecimento especial à *Queen* Cibele, nossa “chefe”, tão querida e tão competente. Seu trabalho e sua ajuda são essenciais à sobrevivência desse laboratório.

Agradeço à Bete, técnica do laboratório de microscopia confocal da FMRP, que me ajudou a fazer excelentes imagens, com toda dedicação, doçura e paciência nessa reta final do meu trabalho.

Agradeço, de forma especial, a uma das pessoas mais importantes para mim nessa caminhada de 7 anos, e também na vida: meu amigo Juliano “careca feioso” S(Fr)angalli. Sou abençoada por ter sua amizade, sua paciência, sua ajuda profissional, sua presença durante minha recuperação, ainda que virtualmente. Obrigada pelos memes, pelas DMs, pelas brigas, por você sempre me perdoar quando preciso, por você me fazer rir. O caminho teria sido muito mais difícil se você não estivesse comigo nele.

Não tenho como agradecer a ela sem me emocionar: uma das top 3 melhores pessoas que Deus colocou na minha vida, Dra. Gabriela Leal, mas para mim ela é Gabi, que tantas vezes fez tanto por mim de uma forma tão simples, e tão fundamental. Presente que a Embrapa Gado de Leite me deu, que há 5 semanas me disse “se existe alguém que é capaz disso, esse alguém é você” quando eu tinha $\frac{1}{4}$ de tese pronta e nenhum artigo. Tomei para mim essas palavras, acreditei nelas, e hoje tenho dois artigos submetidos e entrego essa tese. Gabi, você é presente de Deus.

Por último, e não menos importante, gostaria de agradecer ao meu pai Juarez e à minha “rainha-mãe” Helena, por tudo. Meu pai, o meu padrão-ouro de caráter; minha mãe, minha inspiração de força e garra. Tudo o que tenho, tudo o que sou, e por eu ter conseguido vencer todas as dificuldades da vida e ter conseguido chegar até aqui, devo isso a vocês. Todas as palavras do mundo não descreveriam o quanto eu os amo. Vocês são minha fortaleza, a luz que brilha no farol. Este trabalho é para vocês.

Junto aos meus pais, agradeço a Deus, pela minha vida, pelas minhas muitas vidas. Por cada luta, pelo fogo que me forjou. Pela salvação na cruz. Esse trabalho, assim como minha vida, é para Tua honra e Tua glória.

E agradeço à Capes, à Fapesp e ao CNPq pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e Processo CNPq (407223/2021-5).

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu;
há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;
tempo de matar e tempo de curar; tempo de derrubar e tempo de edificar;
tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de saltar de alegria;
tempo de espalhar pedras e tempo de juntá-las; tempo de abraçar e tempo de afastar-se;
tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de deitar fora;
tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar;
tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz.”

(Livro de Eclesiastes, capítulo 3, versículos 1 a 8)

RESUMO

SARAIVA, H. F. R. A. **Estudo sobre os efeitos de diferentes sistemas de maturação *in vitro* na progressão meiótica, expressão gênica e comunicação em complexos *cumulus*-oócitos bovinos.** 2023. 122 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

A maturação *in vitro* (MIV) é a etapa mais delicada no sistema de produção *in vitro* de embriões (PIVE), pois ainda existem grandes limitações em mimetizar *in vitro* condições que sejam similares às que são encontradas dentro do folículo. Fisiologicamente, a comunicação entre células foliculares e gameta é essencial para que se propague os sinais hormonais que culminam com a maturação e aquisição da competência oocitária ao desenvolvimento. Entretanto, essa comunicação é obstruída precocemente quando se retira o complexo *cumulus*-oócito do ambiente folicular para submetê-lo ao sistema *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes sistemas de MIV sobre a progressão meiótica, a comunicação entre *cumulus* e oócito e a modulação da expressão gênica, parâmetros que conferem qualidade ao gameta. Para isso, foram realizados dois estudos. No Estudo 1, intitulado “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”, foram analisados oócitos e células do *cumulus* imaturos *versus* pré-maturados com o precursor do peptídeo natriurético tipo C (CNP) e hormônios esteróides, e durante a MIV em meio de maturação convencional, ou em meio modificado com suplementação de ampirregulina (AREG), IGF1, estradiol e progesterona, precedidos ou não pela pré-maturação. Nesse estudo foram avaliados a eficiência de manutenção do bloqueio meiótico pelo CNP, os efeitos dos diferentes sistemas de MIV sobre: a manutenção das comunicações entre oócito e *cumulus*, avaliada através da densidade de projeções transzonais íntegras (TZPs); a expansão das células do *cumulus* durante a MIV; as taxas de maturação; e expressão de genes relacionados a esses mecanismos. A adição da etapa de pré-MIV com CNP promoveu uma alteração na cinética de maturação, resultando em menor taxa de MII às 19h de MIV, porém com cerca de 24% dos oócitos atingindo o estágio de MII às 9h de MIV. A pré-MIV foi eficiente para manter cerca de 80% dos oócitos em bloqueio meiótico, porém promoveu uma redistribuição da frequência dos estágios de GV na população pré-maturada em comparação com oócitos imaturos, com uma diminuição na frequência de oócitos em GV2 e aumento de GV1 e GV3, além de apresentar cerca de 20% de GVBD ao final das 9h do protocolo. Dessa população pré-maturada enriquecida por GV1, cerca de 15% manteve atividade transcricional durante as últimas

4h de protocolo. Além disso, a pré-MIV promoveu uma diminuição na densidade de TZPs íntegras comparado com o grupo imaturo, e em pré-maturados GV3 comparados com pré-maturados GV1. Às 9h de MIV, o meio modificado promoveu menores densidades de TZPs em comparação com os grupos controles imaturo e da MIV. Pré-MIV e MIV modificada aumentaram os níveis de expressão de *ERK2* e *PRKACA* em células do *cumulus*, comparados com os grupos controle. As taxas de expansão do *cumulus* e os níveis de expressão de *HAS2* e *TNFAIP6* foram menores, e os níveis de *PTX3* maiores nos grupos maturados em MIV modificada, comparados com a MIV controle. Os resultados deste estudo mostraram que a eficiência dos protocolos propostos é influenciada pelo estágio de desenvolvimento do oócito que é submetido ao respectivo sistema, e que diferenças sutis nesse parâmetro podem determinar respostas distintas *in vitro*. No Estudo 2, intitulado “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”, o experimento inicial consistiu em avaliar, em oócitos imaturos, maturados *in vivo* e maturados *in vitro*, os níveis de expressão de quatro genes, sendo dois ligados ao processo de tradução (*CPEB1* e *CPEB4*), e dois associados à degradação de RNAm (*CNOT7* e *ZFP36L2*). A expressão de *ZFP36L2* foi diminuída pelo sistema de MIV. A partir desse resultado, foram selecionados genes associados às maquinarias de tradução e degradação de RNAm para serem analisados, por RT-qPCR, em células do *cumulus* e oócitos dos mesmos grupos experimentais do Estudo 1. Os resultados desse estudo mostraram que tanto a pré-MIV quanto a MIV modificada induziram aumentos na expressão de diversos genes dessas vias em células do *cumulus*. Nos oócitos, os efeitos desses sistemas na expressão gênica foram sutis, e ao contrário da hipótese inicial, a MIV modificada induziu quedas nos níveis de *ZFP36L2*, tanto em RNAm quanto em proteína, porém com pouco impacto sobre os níveis de seus transcritos-alvo. Esses resultados mostraram que embora o oócito seja menos susceptível aos efeitos do sistema de MIV sobre a modulação de transcritos maternos, as células do *cumulus* podem ser afetadas e moduladas com o intuito de incrementar a competência do gameta. Conjuntamente, esse trabalho ajuda a elucidar de forma mais detalhada como características intrínsecas do COC podem afetar os resultados dos sistemas de MIV.

Palavras-chave: complexo *cumulus*-oócito, projeções transzonais, pré-maturação, maturação *in vitro*, vesícula germinativa.

ABSTRACT

SARAIVA, H. F. R. A. **Study of the effect of different *in vitro* maturation systems on meiotic progression, gene expression, and communication in bovine *cumulus*-oocyte complexes.** 2023. 122 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023

In vitro maturation (IVM) is the most fragile stage in *in vitro* embryo production (IVP), since there are still significant limitations in mimicking *in vivo* conditions on *in vitro* environment. Physiologically, the intrafollicular communication is essential to propagate the hormonal signaling that results in oocyte maturation and acquisition of developmental competence. However, this communication is prematurely disrupted when *cumulus*-oocyte complexes are removed from the follicle for *in vitro* processing. The aim of this study was to evaluate the effect of different *in vitro* maturation systems on meiotic progression, *cumulus*-oocyte communication, and gene expression modulations, parameters associated to oocyte quality. For this, two studies were conducted. In Study 1, entitled “Prematuration with CNP and modified *in vitro* maturation systems modulate meiotic progression and *cumulus*-oocyte communication in cattle”, immature oocytes and *cumulus* cells were analyzed in comparison to COCs pre-matured with natriuretic peptide type C precursor (CNP) and steroid hormones, and during IVM in conventional maturation medium, or in modified medium with supplementation of ampyregulin (AREG), IGF1, estradiol and progesterone, preceded or not by pre-IVM. In this study, the efficiency of maintaining meiotic block by CNP, the effects of the different IVM systems on the maintenance of communication between oocyte and *cumulus*, evaluated through the density of intact transzonal projections (TZPs), the expansion of *cumulus* cells during IVM, maturation rates and expression of genes related to these mechanisms were evaluated between groups. The addition of the pre-IMV step with CNP promoted a change in the maturation kinetics, resulting in a lower rate of MII at 19h IVM, but promoting around 24% of oocytes reaching MII stage at 9h IVM. Pre-IMV was efficient in maintaining around 80% of oocytes in meiotic block, however it promoted a redistribution of the frequency of GV stages in the pre-matured population compared to immature oocytes, with a decrease in the frequency of oocytes in GV2 and an increase of GV1 and GV3, in addition to showing around 20% of GVBD at the end of 9h of the protocol. From this enriched GV1 pre-matured population, approximately 15% maintained transcriptional activity during the last 4h of pre-IVM culture. Furthermore, pre-IMV promoted a decrease in intact TZP density compared with

immature COCs, and also in pre-matured GV3 COCs compared with the GV1 counterparts. At 9h of IVM, the modified media promoted lower densities of TZPs compared to the immature and IVM control groups. Pre-IMV and modified IVM increased the expression levels of *ERK2* and *PRKACA* in *cumulus* cells compared with control groups. *Cumulus* expansion rates, and *HAS2* and *TNFAIP6* expression levels were lower, and *PTX3* levels were higher in groups matured in modified media, compared to control IVM. The results of this study showed that the efficiency of the proposed IVM systems are influenced by the stage of development of the oocyte that is submitted to the respective system, and that subtle differences in this parameter can determine different responses *in vitro*. In Study 2, entitled “CNP pre-maturation and modified *in vitro* maturation systems modulate the expression of genes associated with the mechanisms of translation and mRNA degradation in bovine COC”, the initial experiment consisted of evaluating in immature, *in vivo* and *in vitro* matured oocytes, the expression levels of four genes, two associated with translation process (*CPEB1* and *CPEB4*), and two associated with mRNA degradation (*CNOT7* and *ZFP36L2*). *ZFP36L2* expression was decreased by the IVM system. From this result, genes associated with mRNA translation and degradation machineries were selected to be analyzed, by RT-qPCR, in *cumulus* cells and oocytes from the same experimental groups from Study 1. The results of this study showed that pre-IVM and modified IVM increased the expression of several of these genes in *cumulus*. In oocytes, the effect of these IVM system on gene expression was subtle, and contrary to the initial hypothesis, modified IVM induced decrease in *ZFP36L2* levels, both in mRNA and protein, but with little impact on its target transcripts. These results show that although the oocyte had been less susceptible to the effects of the IVM system on the modulation of maternal transcripts, the *cumulus* cells can be affected and modulated with the aim of increasing the gamete's competence. Together, this work helps to elucidate in more detail how intrinsic characteristics of the COC can affect the results of IVM systems.

Key words: *cumulus*-oocyte complexes, transzonal projections, pre-maturation, *in vitro* maturation, germinal vesicle

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Aspectos gerais da foliculogênese e oogênese	18
2.2. A relação entre configuração da cromatina e competência oocitária.....	18
2.3. Formas de comunicação entre oócito e células foliculares	21
2.4. Manutenção do bloqueio meiótico.....	23
2.5. Retomada da divisão meiótica.....	25
2.6. Mecanismos gerais de tradução e degradação de RNAm.....	28
2.7. Estratégias que visam melhorar a modulação da retomada da meiose e eventos relacionados <i>in vitro</i>.....	32
3. HIPÓTESES	36
3.1. Hipótese do Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre <i>cumulus</i> e oócito em bovinos”	36
3.2. Hipótese do Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.....	36
4. OBJETIVOS.....	37
4.1. Objetivo do Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre <i>cumulus</i> e oócito em bovinos”	37
4.1.1. Objetivo geral	37
4.1.2. Objetivos específicos	37
4.2. Objetivo do Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.....	38
4.2.1. Objetivo geral	38
4.2.2. Objetivos específicos	38
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
6. MATERIAL E MÉTODOS	40
6.1. Animais	40
6.2. Coleta de complexos <i>cumulus</i>-oócitos imaturos	41
6.4. Pré-maturação <i>in vitro</i> (pré-MIV)	41
6.5. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	42

6.6. Análise de expressão gênica em células do <i>cumulus</i> e oócitos às 0h, 9h e 19h de MIV	42
6.6.1. Extração do RNA total e tratamento com DNase.....	47
6.6.2. Transcrição reversa do cDNA.....	47
6.6.3. qPCR em tempo real (RT-qPCR) em oócitos e células do <i>cumulus</i>	47
6.7. “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a retomada da divisão meiótica e a comunicação entre <i>cumulus</i> e oócito em bovinos”	48
6.7.1. Visualização do primeiro corpúsculo polar extruso e cálculo das taxas de maturação nuclear.....	48
6.7.4. Avaliação da manutenção do bloqueio meiótico ao final da pré-MIV.....	48
6.7.3. Visualização e quantificação da densidade de TZPs íntegras às 0h e 9h de MIV.....	51
6.7.5. Ensaio de atividade transcricional em oócitos ao final do protocolo de pré-MIV.....	52
6.7.2. Morfometria da expansão das células do <i>cumulus</i> às 0h, 9h e 19h de MIV.....	53
6.7.6. Análise estatística.....	53
6.8. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”	54
6.8.1. Imunodeteção e quantificação da proteína ZFP36L2 às 9h e 19h de MIV.....	54
6.8.2. Quantificação da proteína ZFP36L2 por <i>western blotting</i>	55
6.8.3. Análise estatística.....	55
7. RESULTADOS	56
7.1. Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre <i>cumulus</i> e oócito em bovinos”	56
7.1.1. O tratamento com pré-MIV com CNP resulta em menor taxa de MII às 19h, mas aumenta essa taxa às 9h de MIV.....	56
7.1.2. A pré-MIV com CNP mantém o bloqueio meiótico em 80% dos oócitos, mas promove uma redistribuição dos estágios de GV.....	57
7.1.3. A pré-MIV com CNP modula diferencialmente a comunicação no COC, em função do estágio de GV do oócito.....	59
7.1.4. A expressão de <i>ERK2</i> e <i>PRKACA</i> , genes associados à retomada da meiose e retração de TZPs, é aumentada nos grupos da pré-MIV e MIV modificada.....	63
7.1.6. A MIV modificada reduz a expansão das células do <i>cumulus</i> e modula diferencialmente a expressão de genes relacionados a esse evento ao longo na MIV.....	66

7.2. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”	69
7.2.1. O sistema de MIV altera a expressão de <i>ZFP36L2</i> no oócito.....	69
7.2.2. Dos alvos de <i>ZFP36L2</i> , apenas <i>KDM4C</i> tem sua expressão aumentada nos oócitos maturados em MIV modificada, mas sem a etapa de pré-MIV.....	71
7.2.3. A MIV modificada reduz os níveis da proteína <i>ZFP36L2</i> nos oócitos, em avaliação feita por técnica de IF.....	72
7.2.1. A pré-MIV com CNP e a MIV modificada aumentam a expressão de diversos genes participantes das vias de tradução e degradação de RNAm nas células do <i>cumulus</i>	75
8. DISCUSSÃO	79
8.1. Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre <i>cumulus</i> e oócito em bovinos”	79
8.2. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”	86
9. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
9.1. Conclusões e considerações finais gerais	91
9.2. Conclusões e considerações específicas de cada estudo	92
9.2.1 Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre <i>cumulus</i> e oócito em bovinos”.....	92
9.2.2. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação <i>in vitro</i> modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.....	92
REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento pré-implantacional do embrião em mamíferos se inicia na fecundação do oócito pelo espermatozóide, ambos com características altamente diferenciadas. O zigoto, totipotente, inicia seus ciclos de divisão celular utilizando os estoques maternos de proteínas e RNAs, ativa seu genoma em um período do ciclo espécie-específico, e passa pelo processo de diferenciação em trofotoderma e massa celular interna, formando um blastocisto (Wand e Dey, 2006). A biotécnica produção *in vitro* de embriões (PIVE) se propõe a produzir blastocistos em condições laboratoriais controladas, e ainda que o ambiente fisiológico não seja totalmente mimetizado *in vitro*, a PIVE apresenta índices satisfatórios e na espécie bovina é amplamente utilizada para fins de pesquisa e também comercialmente, sendo o Brasil o segundo maior produtor de embriões *in vitro* no mundo (IETS, 2021).

Na PIVE, complexos *cumulus*-oócitos (*cumulus-oocyte complexes*, COCs) são obtidos de folículos antrais entre 2 e 8 mm de diâmetro e submetidos às etapas de maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões, com posterior transferência dos blastocistos para receptoras para continuidade da gestação. Porém, há décadas a taxa média de produção de blastocistos nesse sistema sem mantém entre 30 e 40%, enquanto oócitos maturados *in vivo* apresentam taxas de produção superiores a 50% (Rizos *et al.*, 2002). Fatores como fase do ciclo estral, diâmetro do folículo do qual o COC é recuperado ou qualidade das células da *cumulus* podem interferir na competência oocitária ao desenvolvimento (Fair *et al.*, , 1995).

Existe uma comunicação bidirecional altamente regulada entre células *cumulus* e oócito que ocorre por via parácrina, por projeções transzonais (TZPs) e junções *gap* e também por microvesículas que é essencial para a sincronização dos eventos responsáveis pela maturação do oócito e aquisição da sua competência ao desenvolvimento (Albertini *et al.*, , 2003; Macaulay *et al.*, 2014). A retirada do COC em estágio de vesícula germinativa (*germinal vesicle*, GV) do ambiente folicular, como acontece quando o submetemos à MIV, acarreta na ruptura antecipada dessa comunicação. A ausência de moduladores produzidos pelas células da granulosa mural, como o peptídeo natriurético tipo C (CNP), resulta em queda nos níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) no *cumulus* e o início do processo de fechamento das junções do tipo *gap* (Norris *et al.*, 2010). Como o *cumulus* é a principal fonte de GMPc para o oócito, a diminuição de seus níveis no compartimento somático se propaga ao gameta, resultando em aumento da hidrólise da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) mediada pela fosfodiesterase 3A (PDE3A). Como resultado, dá-se início à retomada espontânea da divisão meiótica e maturação

de um oócito que ainda não está completamente desenvolvido (Franciosi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). Esse mecanismo espontâneo resulta em assincronia entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática, que corresponde aos processos de reorganização de citoesqueleto e organelas e modulação dos estoques de ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm) e proteínas, os quais serão necessários durante desenvolvimento inicial do embrião prévio à ativação de seu genoma (Gilchrist, 2011). As consequências dessa assincronia, que afeta a expressão gênica, as funções celulares e o metabolismo do COC, tem sido apontadas como alguns dos fatores responsáveis pelas taxas medianas de blastocistos na PIVE (Gilchrist e Thompson, 2007). Estudos desenvolvidos nas últimas décadas tem demonstrado que o emprego de moduladores de GMPc e AMPc durante a MIV melhora as taxas de produção e a qualidade de oócitos e embriões, provavelmente por melhorar a sincronização entre eventos nucleares e citoplasmáticos no COC durante o MIV (Albuz *et al.*, 2010; Franciosi *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015).

Durante seu crescimento, o oócito sintetiza e armazena RNAm e proteínas que serão utilizados durante o período de quiescência transcricional, conhecido como fase de transição materno-embrionária (MET) que se inicia na retomada da divisão meiótica e termina com a ativação do genoma embrionário (Bettegowda *et al.*, 2008). A progressão do ciclo meiótico, os eventos desencadeados pela fertilização e as primeiras clivagens do embrião são dependentes desses estoques maternos de transcritos e proteínas. O correto funcionamento das vias de tradução e degradação de RNAm durante essa etapa interfere de forma direta na competência do oócito em ser fertilizado, e do embrião em clivar e ativar seu genoma (Gosden e Lee, 2010; Hsieh *et al.*, 2011; Ritcher, 2007). Tanto as ativações da tradução de diversas proteínas-chave para o processo meiótico, quanto da degradação de transcritos e remodelamento dos estoques maternos de RNAm, são mediadas por sinalizações originadas nas células da granulosa mural (Lefebvre *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2015), o que nos faz ponderar sobre um possível efeito negativo da MIV sobre o funcionamento dessas vias, considerando que nesse sistema o estímulo proveniente da granulosa é perdido quando o COC é retirado do folículo.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar e comparar o efeito de três sistemas de MIV sobre a progressão meiótica, comunicação entre *cumulus* e oócito, e expressão de genes associados aos processos de tradução e degradação de RNAm materno em bovinos. Os três sistemas estudados foram uma MIV convencional utilizada como grupo controle, uma MIV com meio modificado suplementado com *amphiregulin* (AREG), *insulin growth factor 1* (IGF1), estradiol e progesterona, e a mesma MIV modificada acrescida de uma etapa de pré-MIV que

suplementa CNP, estradiol, progesterona e androstenediona. O trabalho foi dividido em dois estudos. No primeiro estudo, intitulado “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos” foram avaliadas as eficiências deste protocolo de pré-MIV com CNP em manter o bloqueio meiótico e a comunicação no COC, e do protocolo de MIV modificada em modular a comunicação no COC, a expressão de genes relacionados nos COCs, e a capacidade dos oócitos de chegarem ao estágio de MII. Os resultados deste estudo foram compilados em um artigo que se encontra submetido e em análise no periódico *Reproduction*.

O segundo estudo desse trabalho é intitulado “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”, e teve por objetivo avaliar o efeito dos mesmos três sistemas de MIV sobre a expressão de genes pertencentes às vias de tradução e degradação de RNAm. Este estudo contou com um experimento inicial em que foram avaliadas as expressões de dois genes ligados à via de tradução e dois genes ligados à degradação de RNAm em oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. A partir do resultado desse experimento inicial, foram escolhidos os demais genes e a proteína-alvo do estudo, ZFP36L2, cujos níveis proteicos e atividade também foram avaliados neste estudo. Os resultados deste estudo foram unidos em um artigo que se encontra submetido e em análise no periódico *Animal Reproduction*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da foliculogênese e oogênese

A formação dos folículos primordiais ocorre ainda na vida fetal da fêmea, quando células germinativas primordiais migram para a região embrionária em que serão formadas as gônadas, e se diferenciam em células foliculares e oogônias. Ao nascer, uma fêmea mamífera já possui um estoque de milhares de oócitos, os quais estarão disponíveis por toda sua vida reprodutiva. Tais gametas encontram-se bloqueados no estágio de diplóteno da prófase I, e permanecem nessa fase até que ocorra o aumento na secreção de gonadotrofinas por ocasião da puberdade do animal (Clarke *et al.*, 2018; Kerr *et al.*, 2013). A cada onda do ciclo estral da fêmea bovina, que dura cerca de 21 dias, um grupamento de folículos primordiais é recrutado e inicia a progressão do desenvolvimento. As células somáticas se tornam cubóides e passam a proliferar-se, diferenciando-se em células da teca (camada externa) e da granulosa (interna), enquanto o folículo passa pelas categorias primário e secundário. O acúmulo do exsudato produzido pela granulosa, chamado fluido folicular, resulta na formação do antro e na separação das células da granulosa em duas subpopulações: células do *cumulus*, adjacentes ao gameta, e as células murais da granulosa, as quais passam a ter diferentes funções (Liu *et al.*, 2015; Wigglesworth *et al.*, 2015).

Durante seu crescimento, o oócito chega a aumentar seu volume cerca de 100 vezes devido ao acúmulo de RNAm, proteínas e organelas, que sustentarão o desenvolvimento inicial do embrião até a fase de ativação do seu genoma, que no bovino acontece no estágio de 8 células (Mahrous *et al.*, 2012; Svoboda *et al.*, 2015). Entre a formação da cavidade antral, que começa quando o folículo atinge cerca de 2 mm de diâmetro, e o pico pré-ovulatório de LH, ocorrem eventos dentro do folículo e do oócito que culminam na capacitação do gameta a retomar a divisão meiótica, ser fertilizado e gerar um embrião capaz de se desenvolver e vir a termo (Fair *et al.*, 1995).

2.2. A relação entre configuração da cromatina e competência oocitária

Em bovinos, os oócitos em estágio de vesícula germinativa, ou seja, imaturos, podem possuir quatro configurações de cromatina, que se diferem pelo seu grau de compactação: GV0, GV1, GV2 e GV3. A cromatina no estágio GV0 apresenta-se descondensada e dispersa por toda

a região do núcleo. No estágio GV1, um padrão disperso e filamentososo da cromatina se mantém, porém, começam a aparecer alguns pontos de condensação. No estágio GV2 ocorre uma progressão na condensação da cromatina, que se encontra distribuída em *clumps* ou nuvens condensadas dentro do núcleo. No estágio GV3 a cromatina se encontra em seu maior grau de compactação, concentrada em um único aglomerado dentro da vesícula germinativa (Lodde *et al.*, 2007). A posição e a arquitetura do núcleo também sofrem mudanças com a progressão da compactação da cromatina. O núcleo em GV0 encontra-se posicionado em região mais central, enquanto nas outras categorias o posicionamento é periférico. Ondulações no envelope nuclear de GV0 e GV1 são quase ausentes e passam a aumentar nas categorias seguintes (Lodde *et al.*, 2008).

Oócitos no estágio GV0 encontram-se primordialmente presentes em folículos entre 0,5 e 2,0 mm de diâmetro, enquanto os graus GV1 a 3 são encontrados em proporções semelhantes em folículos entre 2 e 8 mm, que são aqueles comumente utilizados na PIVE (Dieci *et al.*, 2016). Em folículos acima de 2 mm provenientes de fêmeas em ciclo natural, a distribuição das populações de GV varia conforme a subespécie: em taurinos, a população de GV apresenta uma distribuição Gaussiana, com predominância de oócitos em estágio de GV2; em zebuínos, ela consiste majoritariamente de oócitos nos estágios GV2 e GV3 (Soares *et al.*, 2020). Em bovinos, folículos a partir de 3 mm de diâmetro já possuem oócitos capazes de retomar e completar a divisão meiótica, o que corresponde a um oócito com diâmetro de 110 μm (Fair *et al.*, 1995). Oócitos GV0 possuem diâmetro em torno de 108 μm , enquanto os GV1 apresentam média de 117 μm , GV2 cerca de 119 μm e oócitos GV3, média de 121 μm de diâmetro (Lodde *et al.*, 2007).

Durante a transição entre os estágios de GV, a condensação gradual da cromatina é acompanhada por alterações epigenéticas em DNA e histonas, como metilação e acetilação (Lodde *et al.*, 2009; Labrecque *et al.*, 2015; Lodde *et al.*, 2017). Ainda que o remodelamento da cromatina e a diminuição da atividade transcricional ocorram isocronicamente, esses eventos não são interdependentes (De La Fuente *et al.*, 2004). Entretanto, ambos são regulados pela comunicação ativa entre oócito e *cumulus*, basicamente por mecanismos controlados pelos níveis de AMPc (Luciano *et al.*, 2011; De La Fuente e Eppig, 2001). O bloqueio experimental das junções *gap* promove a condensação abrupta da cromatina, enquanto o prolongamento da duração dessa comunicação resulta em uma transição mais lenta entre GV0 e GV1, e também em manutenção da atividade transcricional (Luciano *et al.*, 2011; Lodde *et al.*, 2007). O ideal é que esses eventos ocorram de forma gradual e organizada, visto que a compactação rápida ou prematura da cromatina diminui a competência do oócito ao desenvolvimento (Lodde *et al.*, 2013).

Ao atingir cerca de 65% do seu tamanho máximo, o oócito já conseguiu estocar 95% dos RNAs que necessita para seu suprimento durante a MET, e diante desse fato, é necessário que ocorra uma renovação ou *turnover* desses transcritos até que ele complete seu crescimento (Sternlicht e Schultz, 1981; Labrecque et al., 2015). A propagação da sinalização *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), que é iniciada no *cumulus*, promove no gameta a ativação de vias de tradução e de degradação de RNAm. O funcionamento adequado dessas vias é especialmente importante durante a maturação oocitária (Wang et al., 2015; Guillén-Boixet et al., 2016). Como exemplo da importância dessas vias, a tradução e a degradação de RNAm que codificam fatores de transcrição e moduladores epigenéticos de DNA e histonas é uma das etapas essenciais ao processo de silenciamento transcricional do oócito (Chousal et al., 2018).

Apesar da queda na atividade transcricional que ocorre durante a progressão entre os estágios de GV, algumas categorias de RNAm passam a ser mais expressas durante essa fase, como histonas que participam do empacotamento do DNA, e proteínas que participam do processo meiótico (Labrecque et al., 2015). Ao se analisar os perfis de transcriptoma em oócitos dos estágios GV0 a GV3, observa-se que existem categorias de transcritos cujos níveis aumentam durante a progressão entre os estágios, enquanto outras diminuem. Por exemplo, categorias que diminuem ao longo a condensação da cromatina incluem “regulação da apoptose”, “catabolismo”, “proliferação celular” e “transcrição”; categorias que aumentam apenas no início da condensação incluem “montagem de nucleossomos” e “empacotamento de DNA”; transcritos cuja expressão aumenta apenas em GV1 e GV2 são ligadas a transcrição, transporte e localização de proteínas; e categorias ligadas a “organização de cromossomos”, “montagem de DNA”, “tradução” e “transcrição” aumentam no estágio de GV3 (Labrecque et al., 2015). Comparados com GV0 e GV1, oócitos nos estágios mais avançados de GV parecem estar melhor equipados com classes de transcritos e proteínas que os tornam mais competentes, visto que oócitos GV2 e GV3 produzem maiores taxas de blastocistos no sistema *in vitro* quando comparados com GV1 (Lodde et al., 2007; Lodde et al., 2008).

O transcriptoma das células do *cumulus* também passa por alterações em função do estágio de GV, e estudos tem buscado identificar nessas células categorias de genes que possam ser utilizados como marcadores não invasivos de competência do oócito. As maiores diferenças de expressão são encontradas entre *cumulus* de oócitos GV0 e GV1 e envolvem genes ligados ao metabolismo lipídico (Dieci et al., 2016). Categorias relacionadas a “alterações pós transcricionais de RNA”, “síntese proteica”, “sinalização celular” e “metabolismo de minerais”

apresentam aumentos de expressão durante a condensação da cromatina, e refletem a função do *cumulus* de suprir o gameta durante essa fase final de crescimento (Dieci *et al.*, 2016).

Além das diferenças observadas na configuração de cromatina e no perfil do transcriptoma entre os estágios de GV, mudanças no citoplasma também são observadas durante a progressão entre os estágios de GV. Com a transição de GV0 para GV1 e 2, grânulos migram do centro para a região cortical, se organizando em *clusters* no estágio GV3. Também ocorre um aumento de vesículas no ooplasma conforme o oócito progride entre as categorias de GV. O espaço perivitelínico, que é ausente em GV0, aparece em GV1 e aumenta em espessura nos estágios seguintes, e organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi alteram sua conformação, número e se posicionam na região cortical, indicando a proximidade do oócito à sua fase de maturação (Lodde *et al.*, 2008).

2.3. Formas de comunicação entre oócito e células foliculares

A comunicação bidirecional que existe entre oócito e células do *cumulus* permite o suprimento de moléculas essenciais à nutrição, à regulação do ciclo celular e à capacitação do gameta. Em contrapartida, o oócito secreta fatores que modulam a expressão gênica, o metabolismo, a proliferação e a diferenciação das células adjacentes (Clarke, 2018). Essa cooperação entre oócito e células foliculares orienta toda a fase de crescimento folicular e os eventos que precedem a ovulação de um oócito fertilizável (Krisher, 2013). A comunicação dentro do COC pode ocorrer de forma parácrina, por TZPs e junções *gap*, e por vesículas extracelulares.

A “conversa” entre gameta e células foliculares começa no folículo primordial. O crescimento folicular inicia quando o oócito passa a expressar o receptor KIT e as células da granulosa o seu ligante KITL. A interação KIT-KITL resulta na ativação da via de sinalização *phosphoinositide-3-kinase* (PI3k), que dentre várias ações estimula a síntese proteica (Kidder e Vanderhyden, 2010). Essa comunicação parácrina acontece por todo o período de crescimento do folículo. *Growth differentiation factor 9* (GDF9) e a *bone morphogenetic protein 15* (BMP15), dois membros da superfamília *transforming growth factor β* (TGF- β), começam a ser secretados pelo oócito quando o folículo é recrutado (Laitinen *et al.*, 1998). Ambos se ligam aos receptores *bone morphogenetic receptor protein 2* (BMPRII) e *TGF- β receptor type 1* (ALK5) nas células do *cumulus* e ativam a via de transdução *suppressor of mothers against decapentaplegic 2/3* (SMAD2/3), modulando processos como proliferação e diferenciação das células do *cumulus* (Gilchrist *et al.*, 2008). GDF9 também promove a orientação da formação de TZPs e a modulação

da expressão gênica nas células foliculares, pois se observa formação desordenada das TZPs e luteinização precoce das células da granulosa em folículos de camundongas quando *Gdf9* é nocauteado (Elvin *et al.*, 1999; El-Hayek *et al.*, 2018).

A segunda forma de comunicação no COC ocorre por TZPs. No folículo primordial, as células da granulosa e oócito encontram-se ligados através de junções aderentes e junções comunicantes (*gap*). Quando o crescimento se inicia, o oócito passa a produzir glicoproteínas ZP1-4 que vão se acumulando externamente a ele, e montam uma estrutura em forma de uma malha frouxa que é denominada zona pelúcida que, dependendo da espécie, pode variar de 4 a 15 µm de espessura (Wassarman e Litscher, 2013; Baena e Terasaki, 2019). Conforme a zona pelúcida é montada e o oócito cresce, estruturas do tipo filopodia, oriundas da membrana das células da granulosa, se projetam em direção ao oócito para formar canais de comunicação entre esses compartimentos. Essas estruturas, chamadas TZPs, possuem extremidades em formato de bulbo e podem estar em contato com a membrana do oócito, ou com microvilosidades da mesma, através de junções aderentes e do tipo *gap* (Mora *et al.* 2012; Winterhager e Kidder, 2015).

O tamanho e orientação das TZPs varia conforme a espécie. Em camundongos, a maior parte das estruturas não se comunica com o oolema e são mais curtas, enquanto TZPs que se conectam com o oócito possuem comprimento e largura maiores (Baena e Terasaki, 2019). Também no camundongo, as TZPs podem projetar-se em diversas direções, inclusive ramificando-se uma na outra, enquanto em bovinos a projeção das TZPs é paralela, atravessando a zona pelúcida em direção ao oolema (Macaulay *et al.*, 2014; Baena e Terasaki, 2019; Abbassi *et al.*, 2021).

Existem TZPs com estruturas ricas em tubulina, que possuem função estrutural, e TZPs compostas principalmente por F-actina, que possuem função comunicante. No camundongo, estas últimas estão presentes em maior número (Albertini e Rider, 1994; El-Hayek *et al.*, 2018). Na estrutura de TZPs ricas em actina são encontradas proteínas como *disheveled-associated activator of morphogenesis 1* (DAAM1) e *fascin* (FSCN1) que participam do controle da montagem do esqueleto de actina. Proteínas miosinas X (MYO10), que são conhecidas por estimularem o crescimento de estruturas filopodiais, também aparecem concentradas em grupamentos próximos à membrana apical das células do *cumulus* adjacentes ao gameta (El-Hayek *et al.*, 2018). O nocaute de MYO10 leva uma diminuição significativa na densidade de TZPs e altera a expressão gênica no COC, o que resulta em diminuição da fertilidade em camundongas (Crozet *et al.*, 2023).

Na extremidade das TZPs existem junções aderentes e aquelas que são do tipo *gap*, com função comunicante. Junções aderentes são formadas por N-caderinas, que são produzidas pelas células do *cumulus*, e E-caderinas, que são sintetizadas pelo oócito (Wang e Roy, 2010; Mora *et al.*, 2012). Junções *gap* possuem em sua composição proteínas conexas 37 (*GJA4*) e 43 (*GJA1*). *GJA4* são transcritas pelo oócito e *GJA1* pelas células do *cumulus*, e permitem passagem de moléculas de até 1 kDa como nucleotídeos, aminoácidos e açúcares (Clarke, 2022).

O número de TZPs de actina aumenta durante o crescimento do oócito, mas o mesmo não acontece com TZPs compostas por tubulina. Esse aumento é estimulado pelo GDF9, que via sinalização SMAD induz aumento nas expressões de *DAAM1*, *FSCN1* e *MYO10* (El-Hayek *et al.*, 2018). Em diferentes espécies, oócitos desnudos co-cultivados com complexos de células da granulosa podem orientar a formação de novas TZPs, assim como oócitos *Gdf9^{-/-}* que recebem suplementação de GDF9 no meio de cultivo, demonstrando que esse fator secretado pelo oócito participa da formação das TZPs (El-Hayek *et al.*, 2019; Fushii *et al.*, 2021).

TZPs também podem emitir vesículas extracelulares em sua extremidade bulbar, que são endocitadas pelo oócito em um processo apelidado de “sinapse gamética” (Macaulay *et al.*, 2014). Enquanto junções *gap* permitem a passagem de micromoléculas, essas vesículas conseguem transportar moléculas maiores, como proteínas, lipídeos e RNAm, demonstrando que as células do *cumulus* também desempenham um papel importante no suporte dessas macromoléculas para o gameta (Macaulay *et al.*, 2014). Já foi descrito que o transporte de proteínas carreadoras de lipídios FABP3 via TZPs aumenta o conteúdo lipídico em oócitos maturados *in vitro* (Del Collado *et al.*, 2017). A presença de vesículas extracelulares já foi detectada no fluido folicular e comprovada a capacidade das células foliculares de internalizarem-nas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Da Silveira *et al.*, 2012; Sohel *et al.*, 2013). Recente estudo mostrou que microvilosidades da membrana do oócito secretam microvesículas contendo fatores que modulam o desenvolvimento das células foliculares (Zhang *et al.*, 2021). Esses dados demonstram que a troca por vesículas é uma terceira via pela qual oócitos e células foliculares conseguem comunicar-se.

2.4. Manutenção do bloqueio meiótico

O bloqueio do oócito em prófase I é mantido por sinalizações geradas nas células da granulosa. Antes do pico de LH, as células murais da granulosa produzem CNP, enquanto seus receptores *natriuretic peptide receptor 2* (NPR2) estão presentes em pequenas quantidades

nessas células, majoritariamente nas células do *cumulus*, e também no oócito na espécie bovina (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Xi *et al.*, 2017). O receptor NPR2 é uma guanilato ciclase acoplada à membrana, e sua ativação resulta na síntese de GMPc a partir do GTP. Durante essa fase, a expressão de *NPR2* é ativada pelo estradiol, que é produzido na granulosa em resposta ao estímulo de FSH, de GDF9, de BMP15 e de *fibroblast growth differentiation fator 8* (FGF8) (Vanderhyden e McDonald, 1998; Potter, 2011; Zhang *et al.*, 2011). O GMPc se difunde entre as células do *cumulus* e entre *cumulus* e oócito através das junções *gap* presentes nas extremidades das TZPs (Mehlmann, 2013), e atua de maneira chave na manutenção do bloqueio meiótico, bloqueando a atividade hidrolítica enzimas fosfodiesterases (PDEs) tanto no oócito quanto no próprio *cumulus*. No oócito, altos níveis desse nucleotídeo cíclico inibem a atividade PDE3A e consequentemente, a degradação de AMPc no gameta (Shitsukawa *et al.*, 2001).

O bloqueio meiótico no oócito é mantido por altas concentrações de AMPc, e essas concentrações são mantidas pelo bloqueio da atividade das PDE3A que é mediado pelo GMPc, e pela atividade constitutiva dos *G protein-coupled receptor 3 e 12* (GPR3 e GPR12). GPR3/12 ativam enzimas adenilato ciclases (AC), as quais passam a sintetizar AMPc a partir do ATP (Hinckley *et al.* 2005). Entretanto, a maior parte do AMPc dentro do oócito é produzido pelas células do *cumulus* e transportado ao gameta através das junções *gap* (Anderson e Albertini, 1976; Hinckley *et al.*, 2005). O AMPc modula o funcionamento de duas proteínas *kinases*, A (PKA) e B (PKB ou Akt) que por sua vez, fosforilam diversas outras proteínas quinases e fosfatases que regulam de forma complexa e orquestrada os mecanismos de bloqueio e retomada da meiose. O AMPc em altos níveis estimula a atividade de PKA que, através de fosforilação, mantém o balanço entre a proteína Cdc25 inativa e Wee1B (ou Wee2) ativa. Essas duas proteínas são importantes reguladoras do *M-phase promoting factor* (fator promotor da maturação, MPF), que é composto pelas proteínas Cdk1 e ciclina B. Wee1B fosforila e inativa Cdk1, enquanto Cdc25, que é uma proteína fosfatase, executa a ação reversa. Ao ser fosforilada e inativada, Cdc25 se liga a proteínas 14-3-3 e é transportada ao citoplasma, o que evita seu retorno ao núcleo e atrasa a retomada da divisão meiótica. A manutenção em prófase I é auxiliada pela constante degradação de ciclinas B, que é promovida por *anaphase promoter complex* (complexo promotor da anáfase, APC) através de poliubiquitinação (Solc *et al.*, 2008; Pirino *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010; Fan e Sun, 2019). Ao contrário do que acontece com a PKA, altos níveis de AMPc inibem a atividade de PKB/Akt. Um dos substratos da Akt é a quinase *myelin transcription factor 1* (MYT1), que assim como Wee1B, fosforila e inativa Cdk1 (Coleman e Dunphy 1994). Akt também atua na via

de sinalização Pi3K, propagando sinais que resultam na quebra da vesícula germinativa e na regulação da transição MI/MII (Kalous *et al.*, 2009).

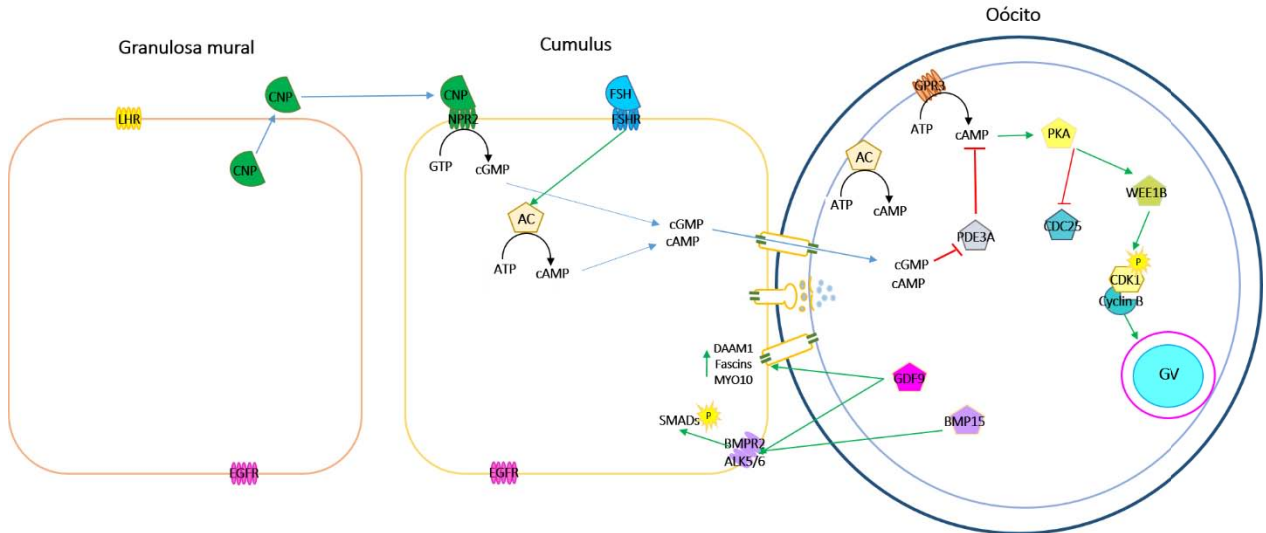


Figura 1 – Manutenção *in vivo* do bloqueio meiótico – a manutenção do oócito no estágio de prófase I é mantido pela comunicação intrafolicular. O peptídeo natriurético tipo C (CNP), produzido pela granulosa, se liga em seus receptores (NPR2) localizados no *cumulus*, os quais promovem a síntese de cGMP (guanosina monofosfato cíclica) a partir do GTP (guanosina trifosfato). A ligação do FSH aos seus receptores no *cumulus* estimula as adenilato ciclasas (AC) a produzirem cAMP (adenosina monofosfato cíclica) a partir do ATP. O aumento dos níveis de cGMP e cAMP no *cumulus* resulta em sua difusão ao oócito através das junções gap, localizadas na extremidade das projeções transzonais (TZPs). Além do suprimento pelo *cumulus*, o oócito também sintetiza cAMP por ação do receptor transmembrana GPR3 e de AC. No oócito, altas concentrações de cGMP inibem a atividade das enzimas fosfodiesterases 3A (PDE3A), cuja função é hidrolisar o cAMP. O bloqueio das PDE3A mediado por cGMP resulta em manutenção dos altos níveis de cAMP durante essa fase, e no estímulo da atividade da proteína quinase A dependente de cAMP (PKA). PKA ativa resulta na fosforilação e inibição da fosfatase Cdc25, um importante regulador do fator promotor da maturação (*maturation promoting factor*, MPF) que é composto por Cdk1 e ciclina B. Enquanto inativa Cdc25, PKA ativa Wee1B, que por sua vez fosforila Cdk1 e mantém o MPF bloqueado, resultando na manutenção do envelope nuclear e do oócito em estágio de vesícula germinativa (GV).

2.5. Retomada da divisão meiótica

Após o pico pré-ovulatório de LH, a retomada da divisão meiótica ocorre em um período de tempo que é espécie-específica. Em bovinos, 6 a 8h após o pico ocorre a quebra da vesícula

germinativa, e o oócito alcança o estágio metáfase I cerca de 3 a 6h depois (Dieci *et al.*, 2013). A ligação do LH aos seus receptores na granulosa resulta na ativação de uma ampla cascata de sinalização que tem como objetivo a maturação e a ovulação de um oócito apto a ser fertilizado. Um dos resultados da ativação do receptor de LH, o LHR, é a diminuição da expressão de *NPR2* nas células do *cumulus*, além de diminuir a sensibilidade deste receptor ao CNP. Isso resulta em diminuição nos níveis de GMPc dentro do *cumulus* e, por diferença de gradiente de concentração, no influxo de GMPc do oócito para suas células adjacentes (Egbert *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2016; Turathum *et al.*, 2021).

O pico de LH aumenta a atividade das adenilato ciclases na granulosa, resultando em um aumento transitório nas concentrações de AMPc (Park *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2006). Nestas células e no *cumulus*, altos níveis de AMPc estimulam a atividade da PKA e essa, por sua vez, estimula a atividade de enzimas PDE5. PDE5 passa a hidrolisar o GMPc, diminuindo ainda mais seus níveis nessas células (Egbert *et al.*, 2016; Egbert *et al.*, 2018). Outra ação da elevação nos níveis de AMPc na granulosa é a ativação de *mitogen- activated protein kinase 14* (MAPK14), que promove aumentos na expressão dos peptídeos *EGF-like* AREG, *epiregulin* (EREG) e *betacellulin* (BTC) (Conti *et al.*, 2006). Esses peptídeos se ligam a receptores EGFR tanto em células da granulosa quanto no *cumulus*, resultando na ativação de uma ampla cascata de sinalização mediada pelas proteínas *extracelular signal- regulate kinases 1 e 2* (ERK1/2), também conhecidas como MAPK3/1. A ativação de ERK1/2 é a chave que gera a amplificação da sinalização do LH e que resulta em aumentos na expressão gênica, proliferação e expansão do *cumulus*, e ativação de vias responsáveis pela retomada do ciclo meiótico no oócito (Richani e Gilchrist, 2018). Uma das ações resultantes da sinalização ERK1/2 é a ativação de calpaínas e de proteínas Arp2/3, que atuam no mecanismo de retração das TZPs (Abbassi *et al.*, 2021). A sinalização ERK1/2 também promove a fosforilação de proteínas conexinas que compõem a estrutura das junções *gap* (Park *et al.*, 2004). Todos esses mecanismos promovem a interrupção da comunicação entre células do *cumulus* e oócito, processo que é necessário para a saída do bloqueio meiótico. Em decorrência da queda nos níveis de AMPc no oócito, PKA diminui sua atividade e o balanço entre Wee1 ativa e Cdc25 inativa é revertido. A fosfatase Cdc25 passa a reverter a fosforilação que inibia a atividade de Cdk1, que por sua vez fosforila e modula vários substratos que participam da cascata de retomada da divisão meiótica (Fan e Sun, 2019).

A ativação da via de sinalização *moloney sarcoma oncogene* (MOS)-MAPK resulta na quebra da vesícula germinativa, ainda que em bovinos ela não seja indispensável para o processo. O aumento dos níveis de MOS no oócito leva à fosforilação de MAP2K1/2 em na

sequência, ativação de ERK1/2 no oócito. ERK1/2 processam a fosforilação de proteínas *lamin* A/C presentes no envelope nuclear. Essa ação resulta na quebra da vesícula germinativa, evento simbólico da retomada da meiose (Choi *et al.*, 1996, Gordo *et al.*, 2001).

Durante a divisão meiótica, é necessário que ocorra um balanço alternado entre as atividades do MPF e APC, assim como das quinases e fosfatases que atuam na regulação desse processo. A degradação de ciclinas B e, como consequência, a diminuição da atividade do MPF, é necessária para que ocorra a correta segregação dos cromossomos homólogos durante a transição entre meioses I e II (Herbert *et al.*, 2003). A modulação orquestrada de proteínas que participam do processo meiótico e da montagem e funcionamento do fuso depende desse balanço, que é promovido pelas vias de tradução e de degradação de RNAm.

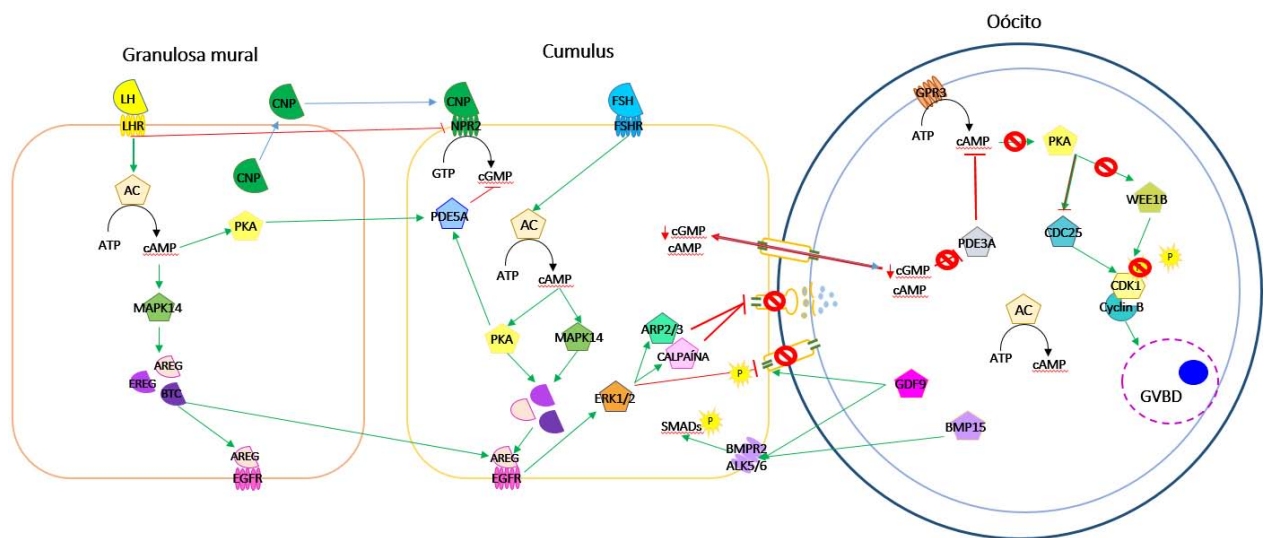


Figura 2 – Retomada da divisão meiótica *in vivo* – a saída do bloqueio em prófase I também é mediado pela comunicação intrafolicular, que se inicia com o pico pré-ovulatório de LH. A Ligação do LH aos seus receptores (LHR) na granulosa resulta em queda nos níveis de cGMP por duas vias: (1) diminuição da expressão e da sensibilidade do NPR2 ao CNP; (2) aumento na produção de cAMP por AC, que estimulam a atividade de PKA e em sequência a atividade de fosfodiesterase 5A (PDE5A), as quais hidrolisam o cGMP. Outra ação resultante da ativação do LHR é o aumento, via MAPK14, na expressão de peptídeos do tipo EGF ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC), os quais se ligam e ativam receptores EGFR tanto na granulosa quanto nas células do *cumulus*. A expressão de AREG, EREG e BTC também podem ser estimuladas por sinalização PKA. Esse aumento sinérgico na transativação do EGFR resulta na ativação da via de sinalização ERK1/2, que atua de forma ampla regulando eventos que desencadeiam na retomada da meiose. Uma delas, que ocorre principalmente em decorrência da queda

no cGMP, é a ativação de proteínas calpaínas e do complexo Arp2/3, os quais promovem o desacoplamento e retração das TZPs. A cascata ERK1/2 também promove a fosforilação de proteínas conexas e rompimento das junções gap. Tanto a quebra da comunicação *cumulus*-oócito via gap e TZPs quanto a queda nos níveis de cGMP no *cumulus* resultam na conseqüente queda desse nucleotídeo no oócito e perda de sua ação inibitória sobre a PDE3A, o que leva ao aumento da hidrólise do cAMP e diminuição do estímulo da PKA. A queda na atividade de PKA resulta na reversão do seu efeito, com diminuição da atividade quinase de Wee1B e aumento da atividade fosfatase de Cdc25, que desfosforila Cdk1 e libera o MPF para promover a quebra da vesícula germinativa e retomada da divisão meiótica.

2.6. Mecanismos gerais de tradução e degradação de RNAm

O controle da tradução e/ou degradação de RNAm é conhecido como controle pós-transcricional da expressão gênica e é importante para regular inúmeros processos biológicos em quase todos os tipos celulares (Susor e Kubelka, 2017). Em oócitos na fase final de crescimento, principalmente aqueles em estágios avançados nos quais a atividade transcricional é mínima, os controles da estabilidade, da tradução e da degradação de RNAm são de extrema importância para guiar os eventos finais de capacitação oocitária e todos os eventos relacionados à maturação e ao desenvolvimento inicial prévio à ativação do genoma de embrião. A ligação entre os mecanismos de tradução e degradação de RNAm e o ciclo meiótico já foi demonstrada em diversos estudos. A inibição da via MAPK está associada a distúrbios na tradução de proteínas essenciais aos eventos da maturação oocitária, como rearranjo de microtúbulos e formação do fuso meiótico (Lefebvre *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2015). Componentes de citoesqueleto que são herdados do oócito, como os centros de organização de microtúbulos (*microtubule organization centers*; MTOCs), possuem função especial durante o desenvolvimento embrionário e sustentam a estrutura celular durante as primeiras clivagens do embrião (Li e Albertini, 2013), o que demonstra a importância dos mecanismos de tradução durante a fase final de crescimento oocitário. As etapas de condensação dos cromossomos, organização do fuso meiótico e separação de cromátides são fatores essenciais para que o oócito seja competente em desenvolver-se em um embrião após a fertilização. A maior parte das proteínas que participam desse processo passa a ser traduzida também em resposta ao pico de LH, e perturbações na maquinaria traducional podem resultar em falhas na segregação cromossômica e aneuploidia (Susor *et al.*, 2015).

Os mecanismos de regulação da tradução e do remodelamento dos estoques de RNAm maternos durante a fase final de crescimento do oócito são dinâmicos e seletivos. Algumas

categorias de transcritos que foram essenciais para o crescimento oocitário, mas que não o serão para o embrião, passam a ser degradadas durante a maturação enquanto outras que serão necessárias para o processo meiótico e primeiras clivagens embrionárias começam a ser mobilizadas e direcionadas à maquinaria de tradução (Su *et al.*, 2007). Tais mecanismos são evolutivamente conservados e sua regulação temporal é necessária para suprir a passagem do oócito e embrião pela TME (Su *et al.*, 2007). O controle dessa temporalidade é feito de diversas formas, dentre elas pela localização espacial dos RNAm (Susor *et al.*, 2015), através da formação de complexos RNA-proteína (ribonucleoproteínas ou RNPs) (Wilhem *et al.*, 2000), e através da modulação do comprimento da cauda poli(A) na 3' *untranslated region* (3' UTR) do transcrito (Radford *et al.*, 2008; Brook *et al.*, 2009).

RNAm são armazenados em associação com proteínas ligadoras (*RNA-binding proteins*, RBPs), e podem co-localizar com as regiões em que suas respectivas proteínas serão necessárias. Agregados de RNPs e RNA ribossomal podem ser encontrados na região nuclear, próximos das regiões que se forma o fuso meiótico, no córtex e no citoplasma (Flemr *et al.*, 2010; Susor *et al.*, 2015). A região subcortical do oócito possui complexos de RBPs que parecem estar associadas ao armazenamento e regulação de RNAs que foram transportados, via TZP, do *cumulus* para o oócito (Macaulay *et al.*, 2014; Macaulay *et al.*, 2016). A ligação do transcrito a proteínas que modulam a localização e o comprimento da cauda poli(A) acontece por meio de reconhecimento e ligação dessas proteínas a sequências específicas na 3' UTR do RNAm. Essa ligação resulta na modulação do destino do RNAm (Piqué *et al.*, 2008).

O início da tradução é controlado por *cytoplasmic polyadenylation element binding proteins* (CPEB), e depende do reconhecimento e ligação de CPEB a sequências conhecidas como elementos citoplasmáticos de poliadenilação (*cytoplasmic polyadenylation elements*, CPE) localizados na 3' UTR no RNAm, e da presença próxima do hexanucleotídeo AAUAAA (Hake e Richter, 1994). CPEB possui dupla função: repressora (quando não está fosforilada) e promotora (fosforilada) da extensão da cauda poli(A). CPEB encontra-se ligada às proteínas *cleavage and polyadenylation specific factor* (CPSF), *poly(A) specific ribonuclease* (PARN) e *poly(A) polimerase D4* (PAPD4). Quando CPEB não está fosforilada, PARN está ativa e mantém a cauda poli(A) curta, o que mantém o RNAm em estado repressivo (Kim e Richter, 2007). A fosforilação de CPEB promove a estabilização das ligações entre ela e CPSF e entre CPSF e o hexanucleotídeo AAUAAA, e diminui a afinidade do transcrito à ribonuclease PARN, que é translocada do complexo (Walser e Lipshitz, 2011). O afastamento de PARN facilita a ativação da polimerase PAPD4, que então processa a extensão da cauda poli(A). A própria cauda poliadenilada induz o

recrutamento e ligação de *poly(A) binding proteins* (PABPs), que medeiam a interação da mesma às proteínas *eukaryotic translation initiation factor 4G* (eIF4G) e 4E (eIF4E) na extremidade cap m⁷G 5'. Esse processo promove a formação de um complexo circular estável. Pela ausência de PARN, a subunidade ribossomal 40S consegue se ligar ao RNAm e inicia a leitura pela 5' UTR, até encontrar o códon de iniciação da tradução (Hake *et al.*, 1998; Radford *et al.*, 2008; Weill *et al.*, 2012).

Os mecanismos de degradação de RNAm também são necessários para a manutenção das funções vitais celulares, e a diminuição da cauda poli(A) (ou desadenilação) é uma das formas pelas quais essa degradação ocorre. Assim como a poliadenilação, a desadenilação também é mediada pelo reconhecimento de sequências específicas na 3' UTR e ligação por proteínas moduladoras (Fenger-Gron, 2005). As proteínas da família ZFP36 (CCCH *tandem ring finger proteins* ZFP36) atuam dessa forma, e são conhecidas como supressoras de processos tumorais, regulando negativamente diversos oncogenes, citocinas, fatores de crescimento e reguladores de metabolismo (Vogel *et al.*, 2017; Suk *et al.*, 2018; Toeuf *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2021). Os *rinc fingers* dessas proteínas se ligam a sequências ricas em adenina e uridina (*AU-rich elements*, ARE) na 3' UTR do RNAm; ligada ao transcrito, as ZFP36 interagem através de sua porção carbono terminal com CNOT7 (também conhecida como CAF1), uma das subunidades catalíticas do complexo desadenilase CCR4-NOT (Fenger-Gron *et al.*, 2005; Sha *et al.*, 2018).

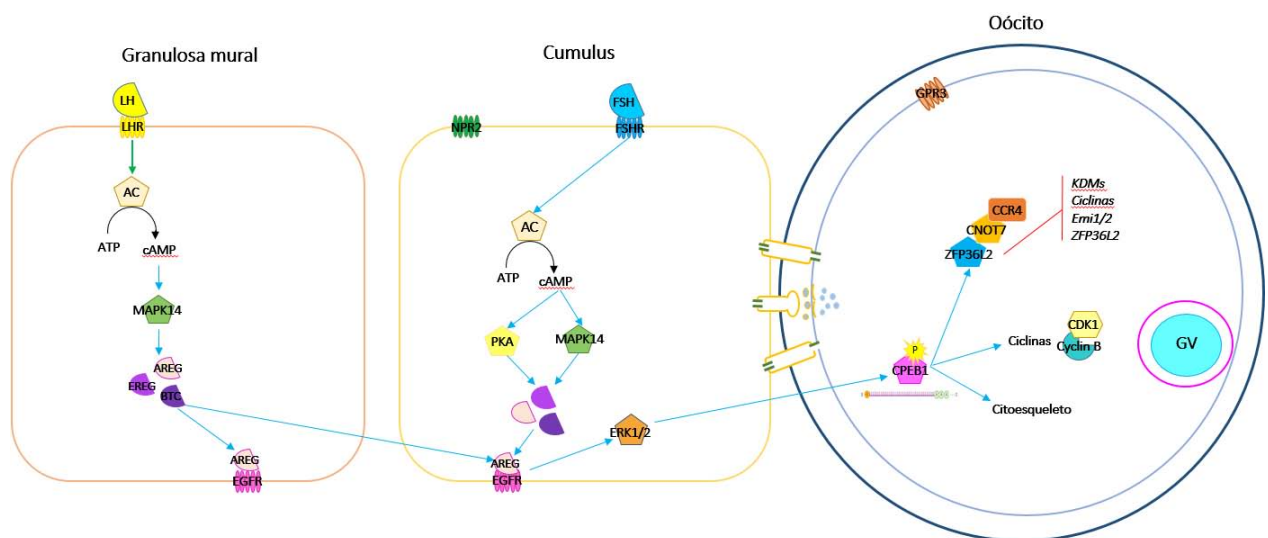


Figura 3 – Retomada da divisão meiótica *in vivo* e tradução de RNAm – O pico pré-ovulatório de LH promove no oócito uma onda inicial de poliadenilação e tradução de RNAm que desempenham papel fundamental na divisão meiótica, como ciclinas, proteínas de citoesqueleto e de montagem do fuso meiótico e membros das maquinarias de tradução e degradação de transcritos. A ativação upstream da via ERK1//2 resulta na fosforilação e ativação de proteínas CPEB1 (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1*). CPEB1 se encontra ligada a sequências específicas da região não traducional 3' do transcrito que são conhecidas como elementos de poliadenilação citoplasmática (*cytoplasmic polyadenylation element*, CPE) e próximas ao hexanucleotídeo AAUAAA. Junto a CPEB1, encontra-se ligado um complexo proteico composto por CPSF (*cleavage and polyadenylation specific factor*), a ribonuclease PARN (*poly(A) specific ribonuclease*), e a polimerase PAPD4 (*poly(A) polimerase D4*). A fosforilação de CPEB1 altera sua conformação estrutural e resulta na translocação de PARN e consequente ativação de PAPD4, que processa a extensão da cauda poli(A), destinando o RNAm à tradução. A proteína ZFP36L2 (ring finger protein like 2) tem sua tradução aumentada nessa fase, e possui ação importante por se ligar e destinar à degradação diversos RNAm durante o ciclo meiótico, como fatores epigenéticos, ciclinas, e seu próprio transcrito. As corretas tradução e degradação de transcritos durante essa fase é essencial para os eventos de divisão meiótica e remodelamentos dos estoques de RNAm que serão consumidos durante o desenvolvimento pré-ativação do genoma embrionário.

No oócito, ZFP36L2 (também conhecida como TIS11D ou BRF1) atua de forma importante no remodelamento dos estoques de RNAm durante a maturação. Estudos em camundongas demonstraram que o nocaute dessa proteína gera fêmeas que ciclam e ovulam normalmente, porém seus embriões falham em ativar o genoma e bloqueiam o desenvolvimento no estágio de 2 células (Ramos, 2012; Ball *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2023). Reguladores do ciclo celular e moduladores epigenéticos, como desmetilases de histonas, são alguns dos alvos da ZFP36L2 durante a maturação oocitária, e a correta degradação desses fatores é essencial para a progressão do ciclo meiótico e adequada maturação oocitária (Chousal *et al.*, 2018).

A fosforilação e modulação da atividade de CPEBs e ZFP36L2 podem ser realizadas por diversas quinases durante a maturação do oócito. Em mamíferos, não existe um consenso a respeito de qual seria a quinase principal na ativação das CPEB, visto que muitas delas participam de maneira importante e redundante no processo meiótico e na ativação das CPEB, como Aurora A e quinases das vias MAPK e ERK1/2 (Kim e Ritcher, 2007; Reyes e Ross, 2016). A fosforilação e inativação de ZFP36L2, em diversos tipos celulares, também pode ser mediada por proteínas diferentes como *p90 ribosomal kinase 1 S6* (RSK1) e a *p38 MAPK-activated protein kinase 2* (MK2) (Hsieh *et al.*, 2021). Até o momento, pouco foi elucidado sobre o mecanismo de

inibição da atividade de ZFP36L2, em oócitos, mediada por fosforilação,, mas em outras linhagens celulares já foi demonstrado que a fosforilação em resíduos de serina na porção C-terminal promove uma mudança conformacional no sítio de ligação entre ZFP36L2 e CNOT7, o que inibe a ligação entre essas duas proteínas e favorece a ligação de ZFP36L2 a proteínas 14-3-3. Esse mecanismo resulta na inibição da atividade de ZFP36L2 (Johnson *et al.*, 2002; Chrestensen *et al.*, 2004; Marchese *et al.*, 2010; Clement *et al.*, 2011).

2.7. Estratégias que visam melhorar a modulação da retomada da meiose e eventos relacionados *in vitro*

A eficiência das tecnologias de reprodução assistida depende principalmente da qualidade dos oócitos que são utilizados nesse sistema. Na PIVE comercial, geralmente são utilizados COCs recuperados de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro, ou seja, COCs que ainda não completaram seu crescimento e ainda não adquiriram a competência necessária para desenvolver-se após a fertilização. A maturação *in vitro* passa então a ser uma etapa-chave para o sucesso dessas tecnologias. Entretanto, o desenvolvimento de protocolos eficientes torna-se um desafio, devido à ampla heterogeneidade na população de COCs que é obtida dessa categoria de folículos, o que se reflete nas taxas medianas de blastocistos que há décadas se mantém entre 30 a 40% (Rizos *et al.*, 2002; Galli, 2017). Considerando as estatísticas, se cinco COCs saudáveis coletados por ovários são submetidos à PIVE, em média 1,75 blastocistos são produzidos e rendem 0,6 neonatos (Luciano *et al.*, 2018). Esses dados revelam que há muito o que se aprimorar nos sistemas de MIV.

In vivo, a seleção do oócito dominante acontece quando o folículo atinge cerca de 8 mm de diâmetro, e até que ele atinja o tamanho pré-ovulatório (em torno de 15 mm), diversos processos foliculares “capacitantes” acontecem e tornam o oócito competente (Fortune, 1994, Hyttel *et al.*, 1997; Dieleman *et al.*, 2002). *In vitro*, a retirada prematura do COC do folículo resulta na perda do contato com esses fatores capacitantes. Na ausência do CNP (oriundo da granulosa) e consequente ativação do seu receptor NPR2, os níveis de GMPc e consequentemente de AMPc caem no oócito, promovendo a retomada prematura – e rápida – da divisão meiótica. Além disso, a sinalização promovida pela ativação do EGFR, que se inicia na granulosa e ativa uma série de vias requeridas à aquisição da competência, também é perdida *in vitro*, o que pode resultar em falhas nos eventos que decorrem da ativação dessa sinalização (Richani e Gilchrist, 2022).

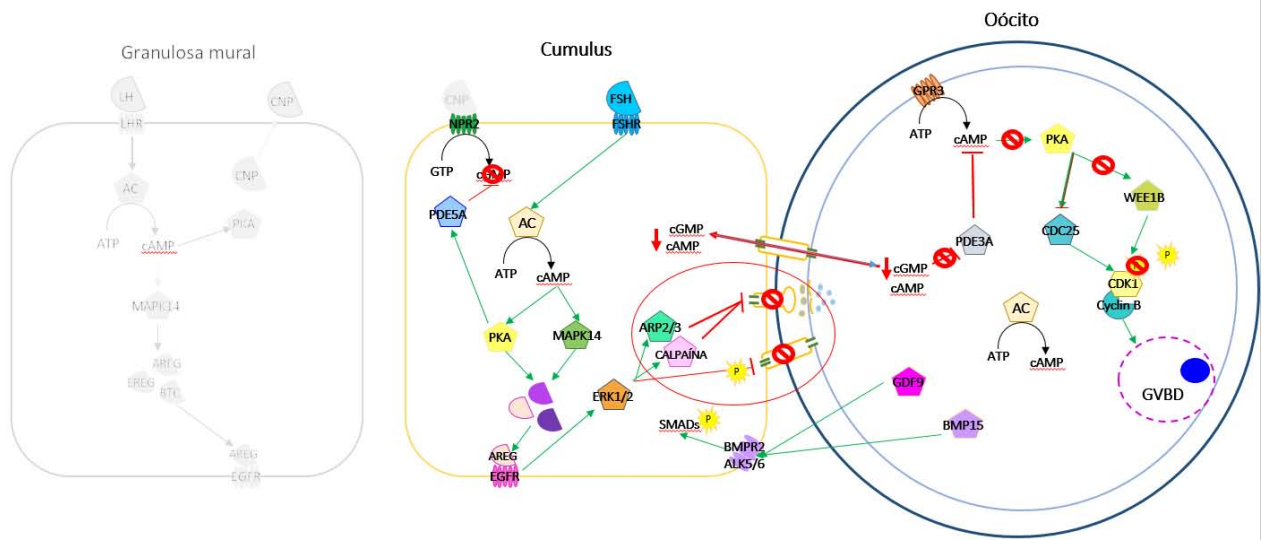


Figura 4 – Retomada espontânea da meiose no sistema *in vitro* – A regulação da retomada da divisão meiótica que ocorre no ambiente *in vivo* é perturbada no sistema *in vitro* devido à perda da sinalização proveniente da granulosa. Na ausência do CNP e pela presença do FSH do meio de MIV, os níveis de cGMP diminuem de forma rápida no *cumulus*, enquanto que um aumento transitório de cAMP estimula a expressão de peptídeos do tipo EGF e a transativação do EGFR. Devido à baixa concentração de cGMP, ERK1/2 promove, via Arp2/3 e calpaínas, a retração prematura das TZPs. Esse processo leva à diminuição dos níveis de cGMP e conseqüentemente de cAMP no oócito, desencadeando a quebra da vesícula germinativa e a retomada da divisão meiótica.

Diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos com o objetivo de prolongar a duração do bloqueio meiótico ou “atrasar” a retomada da divisão meiótica *in vitro*, na tentativa de reduzir os prejuízos causados pela retomada rápida da meiose, logo, pela perda da sincronização entre os eventos nucleares e citoplasmáticos que ocorre nesse sistema. A suplementação do meio de MIV com moduladores de AMPc ou inibidores do MPF tem sido estudada há algumas décadas. Butirolactona e roscovitina são dois inibidores reversíveis de Cdk1-ciclina B que, por serem permeáveis, podem ser suplementados em meio de cultivo (Kitagawa *et al.*, 1993; Meijer *et al.*, 1997). Ambos já foram testados em diversas espécies e, mesmo em combinação, não mostraram efeitos negativos sobre os embriões resultantes (Lonergan *et al.*, 2000; Mermillod *et al.*, 2000; Adona *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; De Bem *et al.*, 2011). Entretanto, grande parte dos estudos com esses dois moduladores não mostrou incrementos significativos na produção ou qualidade dos embriões ao serem comparados com o

sistema convencional de MIV, o que leva a concluir que o bloqueio da retomada da meiose é apenas um dos eventos que contribuem para a capacitação e qualidade do oócito.

Protocolos que propõem a modulação dos níveis de AMPc produzem respostas melhores do que o bloqueio direcionado de quinases responsáveis pelo controle da atividade do MPF, provavelmente porque essa modulação afeta dois eventos envolvidos com a aquisição da competência: altos níveis de AMPc não apenas atrasam a retomada da meiose, mas também prolongam o tempo de comunicação entre oócito e *cumulus*, visto que a queda nos níveis de AMPc resulta na diminuição da comunicação, via junções *gap*, entre oócito e *cumulus* (Luciano *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004). Inibidores de PDEs e ativadores de AC costumam ser utilizados em protocolos de MIV divididos em duas fases. A primeira é comumente chamada “pré-maturação” (pré-MIV) ou etapa “capacitante” (CAPA), seguida da MIV propriamente dita. A ideia geral dessa estratégia é induzir no oócito, durante a etapa de pré-MIV, altos níveis de GMPc e AMPc, com o objetivo de atrasar a retomada da meiose e prolongar o tempo de comunicação no COC, permitindo que processos moleculares e citoplasmáticos aconteçam antes da quebra da vesícula germinativa e melhorem a competência do oocitária.

Inicialmente, protocolos bifásicos testaram suplementar o meio de maturação com análogos permeáveis do AMPc, como 8-bromo AMPc e dibutilil-AMPc (Cho *et al.*, 1974; Somfai *et al.*, 2003; Appeltant *et al.*, 2015). Em seguida, começaram a ser testados inibidores farmacológicos inespecíficos de PDE (*3-isobutyl-1-methylxanthine* (IBMX) e hipoxantina) (Downs *et al.*, 1986; Albuz *et al.*, 2010), inibidores de PDE3A (milrinona e cilostamide) (Thomas *et al.*, 2004; Luciano *et al.*, 2011), ativadores de AC (forskolin e iAC) (Luciano *et al.*, 2004; Richani *et al.*, 2014) e inibidores de PDE5A e PDE6 (sildenafil) (Botigelli *et al.*, 2018), que mostraram resultados bons ou, às vezes, até controversos. O CNP, modulador fisiológico do GMPc no *cumulus*, também vem sendo testado em protocolos de pré-MIV em diversas espécies, mas por ser um modulador fisiológico, sua eficiência depende da dose utilizada e a duração do protocolo (Franciosi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Soto-Heras *et al.*, 2019, Assareh *et al.*, 2022). Na maioria dos estudos realizados até o momento, as melhorias observadas pelo emprego dessas estratégias são modestas, e muitas vezes são observadas em parâmetros qualitativos (qualidade de oócitos e embriões produzidos e cinética de desenvolvimento) em detrimento de características quantitativas (taxas de produção) (Soares *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018;). A heterogeneidade da população de COCs que são submetidas aos protocolos de pré-MIV parece ser a causa dessas respostas, já que alguns estudos demonstraram que populações iniciais de

GV se beneficiam mais dessas estratégias do que oócitos mais próximos do crescimento completo (Lodde *et al.*, 2007; Dieci *et al.*, 2016).

Além das estratégias que visam modular os níveis de GMPc e AMPc, o emprego de peptídeos EGF-*like* vem sendo estudado com o objetivo de mimetizar um dos efeitos mais importantes que são desencadeados pelo pico de LH, que é a ativação de EGFR e suas vias decorrentes, tanto no *cumulus* quanto no oócito. A suplementação desses peptídeos já foi avaliada em várias espécies, como bovina (Soares *et al.*, 2017), humana (Akin *et al.*, 2022), caprina (Assareh *et al.*, 2022), ovina (Rouhollahi Varnosfaderani *et al.*, 2020), e suína (Zhang *et al.*, 2017), e tem apresentado resultados promissores. Em humanos, o AREG é o peptídeo tipo EGF que mais se acumula no fluido folicular após o pico de LH, e foi associado como marcador de qualidade devido à capacidade de promover expansão de *cumulus* (Zamah *et al.*, 2010). Alguns benefícios da adição de AREG ao meio de maturação são: aumento nas expressões de genes ligados a metabolismo e expansão das células do *cumulus* (Prochazka *et al.*, 2012; Sugimura *et al.*, 2014), incrementos nas taxas de maturação e na qualidade embrionária (Rouhollahi Varnosfaderani *et al.*, 2020; Akin *et al.*, 2022), expressão de genes marcadores de qualidade e maior razão massa celular interna:trofotoderma em embriões derivados de transferência nuclear (Assareh *et al.*, 2022). Além disso, esse tipo de suplementação tem se mostrado benéfica em modular, via PI3k-Akt-mTOR, a tradução de diversos transcritos no oócito (Chen *et al.*, 2013).

3. HIPÓTESES

3.1. Hipótese do Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”.

A pré-maturação com CNP mantém o bloqueio meiótico e a comunicação no COC por 9h, enquanto a MIV modificada promove a ativação de vias que modulam comunicação entre *cumulus* e oócito e a cascata de retomada da meiose de forma mais “fisiológica”, melhorando as taxas de maturação oocitárias.

3.2. Hipótese do Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.

A pré-maturação com CNP e a maturação modificada aumentam a expressão de genes das vias de tradução e degradação de RNA e melhoram a qualidade da maturação citoplasmática do oócito.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo do Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”.

4.1.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência do protocolo de pré-MIV com CNP para manter o bloqueio meiótico e a comunicação via projeções tranzonais no complexo *cumulus*-oócito, e da MIV modificada em melhorar as taxas de maturação oocitária.

4.1.2. Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de manutenção do bloqueio meiótico ao final da pré-MIV (Pm-0h), através de classificação e análise da distribuição dos estágios de GV após protocolo de coloração por imunocitoquímica do envelope nuclear e cromatina com Hoechst, e comparar com oócitos imaturos (COC-0h);
- Avaliar se há atividade transcricional dos oócitos durante nas últimas 4h da etapa de pré-MIV, através de ensaio de marcação fluorescente de RNA nascente;
- Quantificar e comparar as taxas de primeiro corpúsculo polar extruso (estágio MII) entre MIV controle (Cm), MIV modificada (Mm) e pré-MIV seguida de MIV modificada (Pm-Mm) às 9h e 19h de MIV;
- Mensurar e comparar a densidade de TZPs íntegras entre os grupos às 0h (COC-0h e Pm-0h) e os três grupos de MIV às 9h de MIV, após coloração com Actin Green 488 Phalloidin;
- Mensurar e comparar a expansão das células do *cumulus* entre os grupos Cm, Mm e Pm-Mm às 0h, 9h e 19h de MIV;
- Analisar e comparar os níveis de expressão de *ERK2*, *PRKACA*, *HAS2*, *PTX3* e *TNFAIP6* nas células do *cumulus*, e *GDF9* e *BMP15* em oócitos às 0h, 9h e 19h (estágio de MII) de MIV, por RT-qPCR.

4.2. Objetivo do Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.

4.2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da etapa de pré-MIV com CNP e da MIV modificada na expressão de genes associados às vias de tradução e degradação de RNAm no COC, e na expressão e atividade da proteína ZFP36L2 em oócitos bovinos.

4.2.2. Objetivos específicos

- Determinar e comparar os níveis de expressão de *CPEB1*, *CPEB4* (tradução de RNAm), *CNOT7* e *ZFP36L2* (degradação de RNAm) em oócitos imaturos, maturados *in vivo* e maturados *in vitro* (MIV controle), por RT-qPCR;
- Avaliar e comparar os níveis de expressão de *CPEB1*, *CPEB4*, *CNOT7*, *ZFP36L2*, *MAPKAPK2* e *YWHAZ* entre oócitos dos grupos COC-0h e PM-0h, e Cm, Mm e Pm-Mm às 9h e 19h (estágio de MII) de MIV, por RT-qPCR;
- Quantificar e comparar os níveis da proteína ZFP36L2 entre oócitos dos grupos Cm, Mm e Pm-Mm às 9h e 19h de MIV (estágio de MII), por protocolo de imunocitoquímica e *western blotting*;
- Determinar e comparar os níveis de expressão dos genes-alvo da ZFP36L2: *KDM1B*, *KDM3B*, *KDM4B*, *KDM4C*, *KDM5A*, *KDM5B*, *KDM5C*, *CCNE1*, *FBXO43* e *FBXO5* em oócitos às 9h e 19h (estágio de MII) de MIV, por RT-qPCR;
- Determinar e comparar os níveis de expressão de *CPEB1*, *CPEB4*, *EIF4A3*, *EIF4B*, *EIF4E*, *EIF4G2*, *PAIP1*, *PABPC1* e *PABPN1* (tradução de RNAm), *CNOT7* e *ZFP36L2* (degradação de RNAm), *MAPKAPK2* e *YWHAZ* em células do *cumulus* às 0h, 9h e 19h (apenas células de oócitos em estágio de MII) de MIV.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento do Estudo 1, intitulado “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”, encontra-se demonstrado na Figura 1. COCs viáveis foram submetidos diretamente à MIV em meios de maturação controle (Cm) ou modificada (Mm) ou pré-maturados por 9h em meio de pré-MIV suplementado com CNP, e em seguida maturados em meio de MIV modificada (Pm-Mm). COCs imediatamente coletados dos folículos (COC-0h) foram usados como grupo controle nas avaliações dos COCs ao final da pré-MIV (Pm-0h). A manutenção do bloqueio meiótico e distribuição dos estágios de GV foram realizadas no momento 0h. A avaliação da comunicação no COC, baseada na quantificação de TZPs íntegras, foi realizada às 0h e 9h de MIV. A morfometria da expansão do *cumulus* foi avaliada às 0h, 9h e 19h de MIV, e nesses mesmos horários foram realizadas análises de expressão gênica nas células do *cumulus* e nos oócitos dos respectivos grupos experimentais.

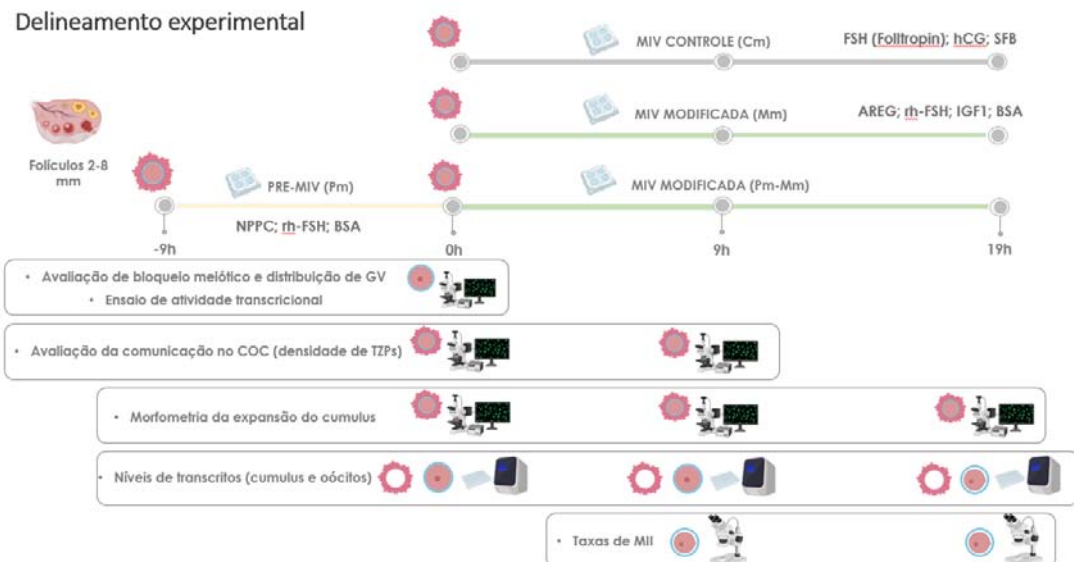


Figura 5 – Delineamento experimental do Estudo 1

O delineamento experimental do Estudo 2, Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”, está demonstrado na Figura 2 e é dividido em dois experimentos. No Experimento 1 (não descrito na Figura 2), os níveis de expressão de *CPEB1*, *CPEB4*, *CNOT7* e *ZFP36L2* foram avaliados por RT-qPCR em oócitos

imaturos, maturados *in vitro* (MIV controle) e maturados *in vivo*. Oócitos imaturos e maturados *in vitro* foram obtidos de COCs recuperados de vacas Nelore provenientes de abatedouro comercial, enquanto oócitos maturados *in vivo* foram obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick-up*, OPU) em vacas Nelore previamente sincronizadas. No Experimento 2, os mesmos grupos experimentais e horários de coleta durante a MIV do Estudo 1 foram adotados para avaliar dos níveis de expressão de 13 genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm em *cumulus* e oócitos. Os níveis da proteína ZFP36L2 foram avaliados às 9h e 19h de MIV utilizando protocolo de imunocitoquímica e *western blotting*. Os níveis de expressão de 10 transcritos-alvo da ZFP36L2 foram avaliados em oócitos às 9h e 19h de MIV.

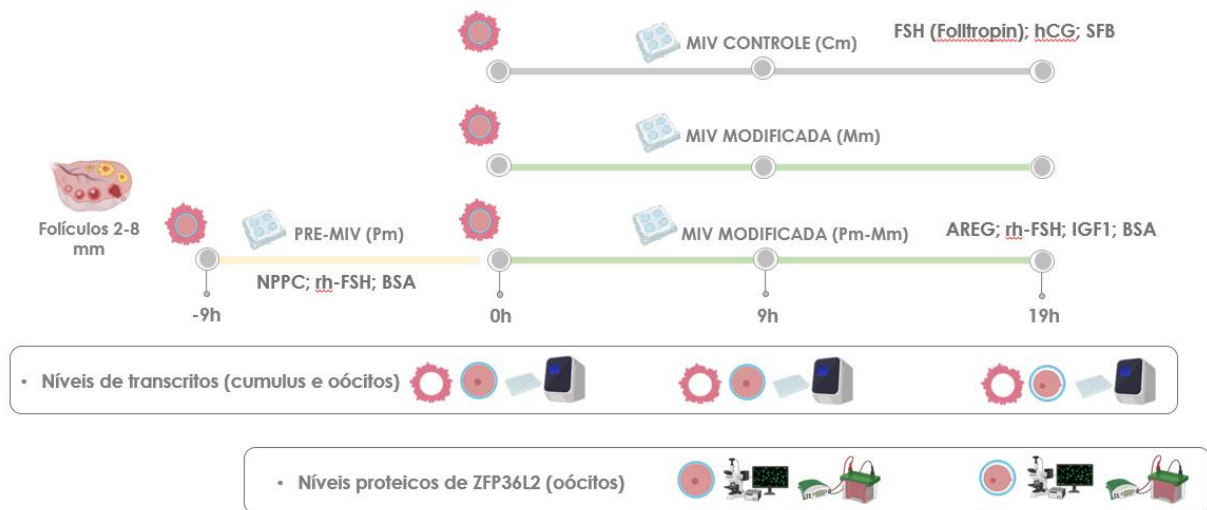


Figura 6 – Delineamento experimental do Estudo 2

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Animais

Para a realização dos experimentos do Estudo 1 e do experimento 2 do Estudo 2, ovários post-mortem de fêmeas cruzadas foram obtidos de abatedouro comercial da região de Pirassununga, sendo dispensada a necessidade de aprovação pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga, SP. Para a realização do experimento 1 do Estudo 2, foram utilizadas amostras previamente coletadas de oócitos imaturos, maturados *in vitro* e *in vivo*, remanescentes do estudo de Del

Collado *et al.* (2017). O citado estudo foi aprovado pelo CEUA – USP, com o número 14.1.675.74.7. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, da Sociedade de Estudo da Reprodução (Society for the Study of Reproduction).

6.2. Coleta de complexos *cumulus*-oócitos imaturos

Ovários de fêmeas bovinas de raças cruzadas foram obtidos de abatedouro comercial da região e transportados até o laboratório em solução salina (0,9% NaCl) aquecida a 30°C. Os ovários foram lavados e mantidos em solução salina pré-aquecida durante todo o processo de aspiração, em que foram utilizadas agulhas 18-gauge acopladas a seringas de 10 mL. Os COCs foram recuperados de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro e depositados em tubos cônicos de 50 mL para decantação. Ao se formar um pellet, parte do fluido folicular sobrenadante foi centrifugada por 5 min a 800 x *g* para separação de debris celulares e hemácias, e o fluido límpido foi utilizado para rastreamento dos COCs. Foram selecionados COCs com duas ou mais camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma homogêneo (Graus I e II). Após seleção, também em fluido folicular, os COCs foram lavados três vezes em solução de lavagem composto por TCM 199 com sais de Earle, L-glutamina, 25 nM de HEPES, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio e 10 mg/mL de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA). COCs recém recuperados dos folículos foram utilizados como grupo controle imaturo 0h (COC-0h).

6.4. Pré-maturação *in vitro* (pré-MIV)

Após seleção e lavagem, parte dos COCs foram destinados à etapa de pré-MIV, de acordo com protocolo de Soares *et al.* (2017). Os COCs foram lavados três vezes em meio de pré-MIV, composto por TCM 199 com sais de Earle, L-glutamina, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (GIBCO, #Cat 11150-059), 0,4% de BSA, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 100 nM de peptídeo natriurético tipo C (CNP, Sigma-Aldrich N8768), 10⁻⁴ UI/mL de FSH recombinante humano (rh-FSH, Gonal-F, Merck), 500 ng/mL de estradiol (Sigma-Aldrich E2758), 50 ng/mL de progesterona (Sigma-Aldrich P8783) e 50 ng/mL de androstenediona (Sigma-Aldrich A9630). A pré-MIV foi realizada em placa de 4 poços, com até 50 COCs em 400 µL de meio por poço, por 9h a 38,5°C, 5% CO₂ e umidade máxima.

6.5. Maturação *in vitro* (MIV)

COCs imaturos foram lavados três vezes em meio de maturação de acordo com o grupo experimental: (1) meio de maturação controle (grupo Cm) composto por TCM 199 com sais de Earle, L-glutamina, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil), e 50 mg/mL de hCG (Vetecor, Ouro Fino Saúde Animal); (2) meio de maturação modificada (grupo Mm) composto por TCM 199 com sais de Earle, L-glutamina, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 0,4% de BSA, 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10 ng/mL de IGF-1 recombinante humano (rh-IGF-1, Invitrogen), 100 ng/mL ampirregulina (AREG, Sigma-Aldrich A7080), 10^{-2} UI/m de rh-FSH, 5µg/mL de estradiol e 150 ng/mL de progesterona; (3) COCs ao final da pré-MIV foram submetidos à MIV modificada (grupo Pm-Mm). Os COCs foram cultivados por 19h a 38,5°C, 5% CO₂ e umidade máxima, em 400 µL de meio de MIV e em número de até 50 COCs por poço.

6.6. Análise de expressão gênica em células do *cumulus* e oócitos às 0h, 9h e 19h de MIV

Para análise de expressão gênica em oócitos e células do *cumulus* às 0h, 9h e 19h de MIV, a mesma metodologia foi utilizada para os Estudos 1 e 2. No Estudo 1, foram avaliados os níveis de expressão de genes associados a mecanismos de sinalização de retomada da divisão meiótica e retração de TZPs (*ERK2* e *PRKACA*) e diferenciação e expansão do *cumulus* (*HAS2*, *PTX3*, *TNFAIP6*), e nos oócitos os marcadores de qualidade *GDF9* e *BMP15*. No Estudo 2 foram avaliadas, nas células do *cumulus*, as expressões de genes relacionados aos mecanismos de tradução (*CPEB1*, *CPEB4*, *EIF4A3*, *EIF4B*, *EIF4E*, *EIF4G2*, *PAIP1*, *PABPC1*, *PABPN1*) e degradação de RNA (*CNOT7*, *ZFP36L2*), além de *MAPKAPK2* e *YWHAZ*, genes associados à modulação da atividade de *ZFP36L2*. Nos oócitos, os níveis de expressão de *CPEB1*, *CPEB4*, *CNOT7*, *ZFP36L2*, *MAPKAPK2* e *YWHAZ* foram avaliados juntamente com *KDM1B*, *KDM3B*, *KDM4B*, *KDM4C*, *KDM5A*, *KDM5B*, *KDM5C*, *CCNE1*, *FBXO43* e *FBXO5*, transcritos que são alvo de degradação da *ZFP36L2* ativa. As sequências utilizadas para o desenho dos primers estão disponíveis nos bancos de dados GenBank e ENSEMBL (Tabelas 2 e 3). Todos os primers foram testados para eficiência antes de serem utilizados nos Estudos.

Foram utilizados pools de 10 oócitos desnudos e pools de células do *cumulus* de 10 COCs, provenientes de sete replicatas biológicas. Para obtenção dos pools, oócitos foram

completamente separados de suas células do *cumulus*, com auxílio de ponteira “stripper”, em gotas de 0,1% PVP em PBS. Às 19h de MIV, os oócitos foram desnudados individualmente e coletados, tanto *cumulus* quanto oócitos, apenas aqueles em estágio MII. As células do *cumulus* foram transferidas para tubos de 1,5 mL livres de DNase e RNase e centrifugadas duas vezes por 5 min a 250 x *g*. O sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o pellet de células foram imersos em nitrogênio líquido. Os oócitos completamente desnudos foram acondicionados no mesmo tipo de tubo com mínimo volume possível de PBS-PVP e também imersos em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até a realização da extração do RNA total.

Tabela 1 – Símbolo, locais de expressão e processos celulares relacionados dos genes escolhidos para análise de expressão, por RT-qPCR, nos Estudos 1 e 2

Gene	Local de expressão	Processo relacionado
<i>CPEB1</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Repressão/poliadenilação de RNAm
<i>CPEB4</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Repressão/poliadenilação de RNAm
<i>CNOT7</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desadenilação/degradação de RNAm
<i>ZFP36L2</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desadenilação/degradação de RNAm
<i>KDM1B</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desmetilase de histona
<i>KDM3B</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desmetilase de histona
<i>KDM4B</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desmetilase de histona
<i>KDM4C</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desmetilase de histona
<i>KDM5A</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desmetilase de histona
<i>KDM5B</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desmetilase de histona
<i>KDM5C</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Desmetilase de histona
<i>CCNE1</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Ciclo celular
<i>FBXO43</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Ciclo celular
<i>FBXO5</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Ciclo celular
<i>PABPC1</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Tradução de RNAm
<i>PABPN1</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Tradução de RNAm
<i>PAIP1</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Tradução de RNAm

<i>EIF4A3</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Tradução de RNAm
<i>EIF4B</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Tradução de RNAm
<i>EIF4E</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Tradução de RNAm
<i>EIF4G2</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Tradução de RNAm
<i>ERK2</i>	<i>Cumulus</i>	Via de sinalização
<i>MAPKAPK2</i>	<i>Cumulus</i>	Via de sinalização
<i>PRKACA</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Via de sinalização
<i>YWHAZ</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Membro da família de proteínas 14-3-3
<i>HAS2</i>	<i>Cumulus</i>	Remodelamento e expansão do <i>cumulus</i>
<i>PTX3</i>	<i>Cumulus</i>	Remodelamento e expansão do <i>cumulus</i>
<i>TNFAIP6</i>	<i>Cumulus</i>	Remodelamento e expansão do <i>cumulus</i>
<i>GDF9</i>	Oócito	Sinalização da diferenciação do <i>cumulus</i>
<i>BMP15</i>	Oócito	Sinalização da diferenciação do <i>cumulus</i>
<i>ACTB</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Controle endógeno
<i>PPIA</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Controle endógeno
<i>SDHA</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Controle endógeno
<i>GUSB</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Controle endógeno
<i>RPL15</i>	Oócito/ <i>cumulus</i>	Controle endógeno

Tabela 2 – Sequências e referências dos primers utilizados para análise de expressão gênica em células do *cumulus* e oócitos nos Estudos 1 e 2

Gene	Primer sequence	Reference
<i>ERK2</i>	F: CGACCACACAGGGTTCTTGA	XM_027566128.1
	R: GACTTGGTGTAGCCCTTGGA	
<i>PRKACA</i>	F: CTGGGGGTCTCATCTACGA	NM_174584.2
	R: CGCACCTTCCCAGAGACAAT	
<i>HAS2</i>	F: CCTAAACATTTGAGACTCCCC	ENSBTAG00000019892
	R: CACAATGCATCTTGTTTCAGCTC	
<i>PTX3</i>	F: GCCGGCAGGTTGTGAAACA	ENSBTAG00000009012
	R: CATATGGATTCTCTTTGTGCCA	
<i>TNFAIP6</i>	F: GCTACAACCCACATGCAAAGG	ENSBTAG00000007239

	R: AAACTCAGGTGAATGCGCTG	
<i>GDF9</i>	F: CAGCCAGATGACAGAGCTTTGAG	ENSBTAG00000009478
	R: CACTGATGGAAGGGTTCCTGCT	
<i>BMP15</i>	F: GCCTCGGATCTTAGGGCATC	ENSBTAG00000045782
	R: TATGTGCCAGGAGCCTCTGA	
<i>EIF4A3</i>	F: ATGAAGGAGTTCCGGTCAGG	ENSBTAG00000016023
	R: ACCTGATCGCCCAATTCTGT	
<i>EIF4B</i>	F: ACGACTCCAGATCTGCACCTG	ENSBTAG00000006883
	R: TCTTCACCGTCAATGGCGAGA	
<i>EIF4E</i>	F: TTAATGCCTGGCTGTGACTAC	ENSBTAG00000009522
	R: ACGATCGAGGTCACTTCGTCT	
<i>EIF4G2</i>	F: CGTTTCAGTGCTTCTTCGGG	ENSBTAG00000020308
	R:CTGCGGAGTTGTCATCTCGT	
<i>PABPC1</i>	F: CAAATACGCTGCGGGAGTTC	ENSBTAG00000046358
	R: AGAGCCGTTCAACCAACATT	
<i>PABPN1</i>	F: TGGCCATCCGAAAGGGTTTG	ENSBTAG00000006884
	R: CCTCGGTCTGTTGTGCTGAT	
<i>PAIP1</i>	F: GGGCCCCAGAACAACGAG	ENSBTAG00000020376
	R: GGGTAGAATTCAGGGGCGTT	
<i>CPEB1</i>	F: TCATGATCATTTGCCAGACTTCC	XM_027521170.1
	R: AGTCTGAGTCCTGGGTGCTC	
<i>CPEB4</i>	F: GGTGTGTGCTATGCTGGGAT	XM_027520495.1
	R: TGGCTTAACTTCCACCCGTT	
<i>CNOT7</i>	F: GCTCAGCGACACAAGTACATA	XM_027530133.1
	R: GCATAGTGAGGGCACAAGGA	
<i>ZFP36L2</i>	F:CAGTTTCCAGCTCCGACCAT	XM_027555128.1
	R: GGGATTTCTCCGTCTTGAC	
<i>MAPKAPK2</i>	F: CATGCAATCGACGAAGGTCC	XM_027565933.1
	R: CACTGGTCATCTCCTCCTTGAC	
<i>YWHAZ</i>	F: GCATCCCACAGACTATTTCC	ENSBTAG00000000236
	R:GCAAAGACAATGACAGACCA	
<i>ACTB</i>	F: CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC	ENSBTAG00000026199
	R: AACGCAGCTAACAGTCCGCC	
<i>PPIA</i>	F: GGTCTGGCATCTTGCCAT	ENSBTAG00000012003
	R: TGCCATCCAACCACTCAGTCT	

<i>SDHA</i>	F: AACCTGATGCTTTGTGCTCTGC R: TCGTCAACCCTCTCCTTGAAGT	ENSBTAG00000046019
<i>GUSB</i>	F: AGAGCGAGTACGGAGCAGATG R: AGCAGGCCTTTCTGGTACTCTTC	ENSBTAG00000000704
<i>RPL15</i>	F: CAAACGCCAGTTCCTAAGG R: TCGAGCAAACCTTGAGCTGGTT	ENSBTAG00000033080

Tabela 3 - Sequências e referências dos primers utilizados no Estudo 2 para análise de expressão dos transcritos-alvo de ZFP36L2 em oócitos).

Gene	Primer sequence	Reference
<i>CCNE1</i>	F: GCTGCCAAACTTGAGGAAATCT R: GGACACAATGGTCAGGGGAC	XM_024978360.1
<i>FBXO43</i>	F: TGAAAACAAATTCTGAGGGGGC R: AACCTGGTGTCTAGCCTGT	XM_010812178.3
<i>FBXO5</i>	F: GGAAGATGACAAGGTGGCATT R: CAAAGTTTTGGCGACAGTAATTC	NM_001082435.2
<i>KDM1B</i>	F: GCTCTTCAAGGAGCAGGAGG R: CTTCACGAAGCTGTAGGCCA	ENSBTAG00000014608
<i>KDM3B</i>	F: AACTGAGAGTGGTGAGATCAAGT R: TCCCCTCTATGCTCTCTCTC	ENSBTAG00000010063
<i>KDM4B</i>	F: TGCCGGAAACGGATGAAGAA R: TAGTAAAGCCCGTTGCGGTT	ENSBTAG00000015487
<i>KDM4C</i>	F: TTTCCCAAATCTCCCTGGGC R: GCTGGAGCAGTCTCTGGC	XM_027549308.1
<i>KDM5A</i>	F: GGTGTTTGAGCTTGTGCCTG R: TGTAACACGACTGACCCACG	ENSBTAG00000020472
<i>KDM5B</i>	F: GACGTGTGCCAGTTTTGGAC R: TCGAGGACACAGCACCTCT	ENSBTAG00000006175
<i>KDM5C</i>	F: ATCACTACCCCTGCCTGGAT R: CTGAGGTCCTGCGCAGATAG	ENSBTAG00000014943

6.6.1. Extração do RNA total e tratamento com DNase

O RNA total foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações. Após a adição de 1,33 μL do reagente co-precipitante GlycoBlue (Thermo Fisher) à fase aquosa das amostras, as mesmas foram deixadas em repouso em -20°C por no mínimo 20 min, e em seguida centrifugadas por 30 min a $20000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado e os pellets formados passaram por duas centrifugações, em etanol 75% em água ultrapura, a $12500 \times g$ por 5 min a 4°C , com o intuito de reduzir contaminações. Após o descarte do sobrenadante ao fim da segunda centrifugação, os pellets foram ressuspendidos em 10 μL de água ultrapura e tratados com o kit DNase I (Invitrogen) para eliminação de contaminações com DNA genômico. O RNA total foi quantificado no equipamento NanoDrop One^C (Thermo Fisher Scientific), e as amostras acondicionadas em freezer -80°C até a realização da transcrição reversa do cDNA.

6.6.2. Transcrição reversa do cDNA

Para a transcrição reversa do cDNA, as concentrações das amostras a serem comparadas foram normalizadas com a amostra de menor concentração total de RNA, através de diluição com água ultrapura. A reação foi realizada com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, o RNA total normalizado foi incubado com 10X RT buffer, 10X RT primers randômicos, 25X dNTP mix (100 nM), MultiScribeTM transcriptase reversa (50 U/ μL) e água ultrapura por 10 min a 25°C , 120 min a 37°C e 5 min a 85°C . As amostras normalizadas foram armazenadas em freezer -20°C até a realização das reações de RT-qPCR.

6.6.3. qPCR em tempo real (RT-qPCR) em oócitos e células do *cumulus*

Para as análises de expressão gênica em oócitos, 15 ng de cDNA foram utilizados por reação de 10 μL . Para as análises em células do *cumulus*, foi necessário realizar uma diluição de 8X em água ultrapura devido ao número de genes estudados, resultando em 7,5 ng de cDNA por reação. As reações foram realizadas utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em equipamento QuantStudio 6 Flex PCR System (Applied Biosystems), de acordo com as seguintes condições: 10 min a 95°C , 45 ciclos de 15 min a 95°C , e 60 seg a 60°C . Os dados de ciclos relativos de threshold obtidos foram normalizados pela subtração da média

geométrica dos ciclos de cinco genes *housekeeping* para as análises em *cumulus* (*ACTB*, *PPIA*, *GUSB*, *RPL15* e *SDHA*) e quatro para oócitos (*ACTB*, *PPIA*, *GUSB* e *RPL15*).

6.7. “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a retomada da divisão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”.

6.7.1. Visualização do primeiro corpúsculo polar extruso e cálculo das taxas de maturação nuclear

Para calcular se a pré-MIV e a MIV modificada incrementavam as taxas de MII, foram calculadas as taxas de extrusão do primeiro corpúsculo polar às 19h de MIV. Cerca de 40 a 50 oócitos por grupo experimental/replicata (em 12 replicatas biológicas) foram completamente desnudados das células do *cumulus* por pipetagens e com auxílio de ponteira de vidro de 135 µm de diâmetro (*stripper*), em gotas de 0,1% PVP em PBS. Oócitos contendo o primeiro corpúsculo polar extruso foram contabilizados como em estágio MII.

Posteriormente, as taxas de MII foram calculadas também às 9h de MIV, em 30 a 50 oócitos por grupo experimental/repetição, em 6 replicatas biológicas.

6.7.4. Avaliação da manutenção do bloqueio meiótico ao final da pré-MIV

Com o objetivo de avaliar se a pré-MIV estava sendo efetiva em manter o bloqueio da meiose oocitária, foi utilizado protocolo de IF para marcação da vesícula germinativa e coloração do DNA, para classificação dos estágios de GV quanto à presença do envelope nuclear e configuração da cromatina. Para isso, 247 oócitos do grupo COC-0h e 139 do grupo Pm-0h foram submetidos à IF de acordo com Sangalli *et al.* (2022) e coloração com Hoechst, e as populações imaturo e ao final da pré-MIV comparadas quanto à distribuição dos estágios de desenvolvimento. Os oócitos foram completamente desnudados de suas células do *cumulus* e fixados em solução de 4% paraformaldeído, lavados e permeabilizados conforme descrito no item 6.7.3. Após a permeabilização, os oócitos foram incubados por 1h em solução contendo 5% de BSA e 10% de soro de cabra em PBS para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, os oócitos foram lavados por 10 min e incubados *overnight* a 4°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Lamin A/C (1:200, Santa Cruz Biotechnology, SC376248). Após essa incubação, os oócitos

passaram por três lavagens de 10 min seguidas por três lavagens de 20 min cada e então incubados por 1h com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo Alexa Fluor 488 (1:200, Thermo Fisher, A11001), a partir desta etapa protegidos da luz. Ao final, os oócitos foram lavados três vezes por 10 min e uma vez por 20 min, e então incubados por 30 min com 10 µg/mL de Hoechst 33342 em PBS (1:1000). Por fim, os oócitos foram lavados por 20 min e montados em 20 µL de ProLong Gold Antifade sobre lâmina e cobertos com lamínula. As imagens foram adquiridas em objetiva de 63x em microscópio invertido de fluorescência Leica DMI8 com Sistema de Imagem Thunder (FAPESP 21/06645-0). A associação da avaliação da cromatina juntamente com o envelope nuclear e o sistema de deconvolução digital do microscópio permitiu a este trabalho sugerir um refinamento na classificação tradicional de estágios de GV (Figura 8). Os parâmetros para a classificação refinada dos estágios de GV proposta neste estudo encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros utilizados para a classificação refinada dos estágios de desenvolvimento de oócitos em vesícula germinativa, baseados nos graus de compactação da cromatina e características do envelope nuclear.

ESTÁGIO	CRITÉRIOS DA CLASSIFICAÇÃO REFINADA
GV1.1	Cromatina filamentososa com poucos pontos de condensação espalhados por toda a vesícula germinativa; Envoltório nuclear grande, liso e redondo, sem irregularidades ou enrugamento
GV1.2	Cromatina filamentososa, número intermediário de pontos de condensação, espalhada por toda a vesícula; Envoltório nuclear grande, liso e redondo, sem irregularidades ou enrugamento
GV1.3	Cromatina filamentososa com número acentuado de pontos de condensação, parte ainda em aspecto fibrilar, formação inicial de aglomerados; envoltório nuclear esférico ou oval, grande, liso, sem irregularidades ou enrugamento
GV2.1	Presença de aglomerados de cromatina com porções ocasionais de cromatina descondensada; envoltório nuclear grande, oval, sem irregularidades ou enrugamento
GV2.2	Aglomerados bem formados de cromatina condensada espalhados por toda a vesícula germinativa; envoltório nuclear grande, aparecimento inicial de irregularidades como leve enrugamento
GV2.3	Aglomerados de cromatina se unindo em um ponto vesícula, condensação de cromatina moderada a alta; envoltório nuclear grande, aparecimento inicial de irregularidades como leve enrugamento
GV3.1	Cromatina com grau moderado a alto de condensação agrupada em uma única estrutura na vesícula; envoltório nuclear em processo de encolhimento, oval, com maior grau de irregularidades
GV3.2	Cromatina com alto grau de condensação; envoltório nuclear com alto grau de irregularidades em processos evidentes de encolhimento
GV3.3	Cromatina com grau de condensação muito elevado; envelope nuclear com alto grau de retração, irregular e justaposto com a cromatina

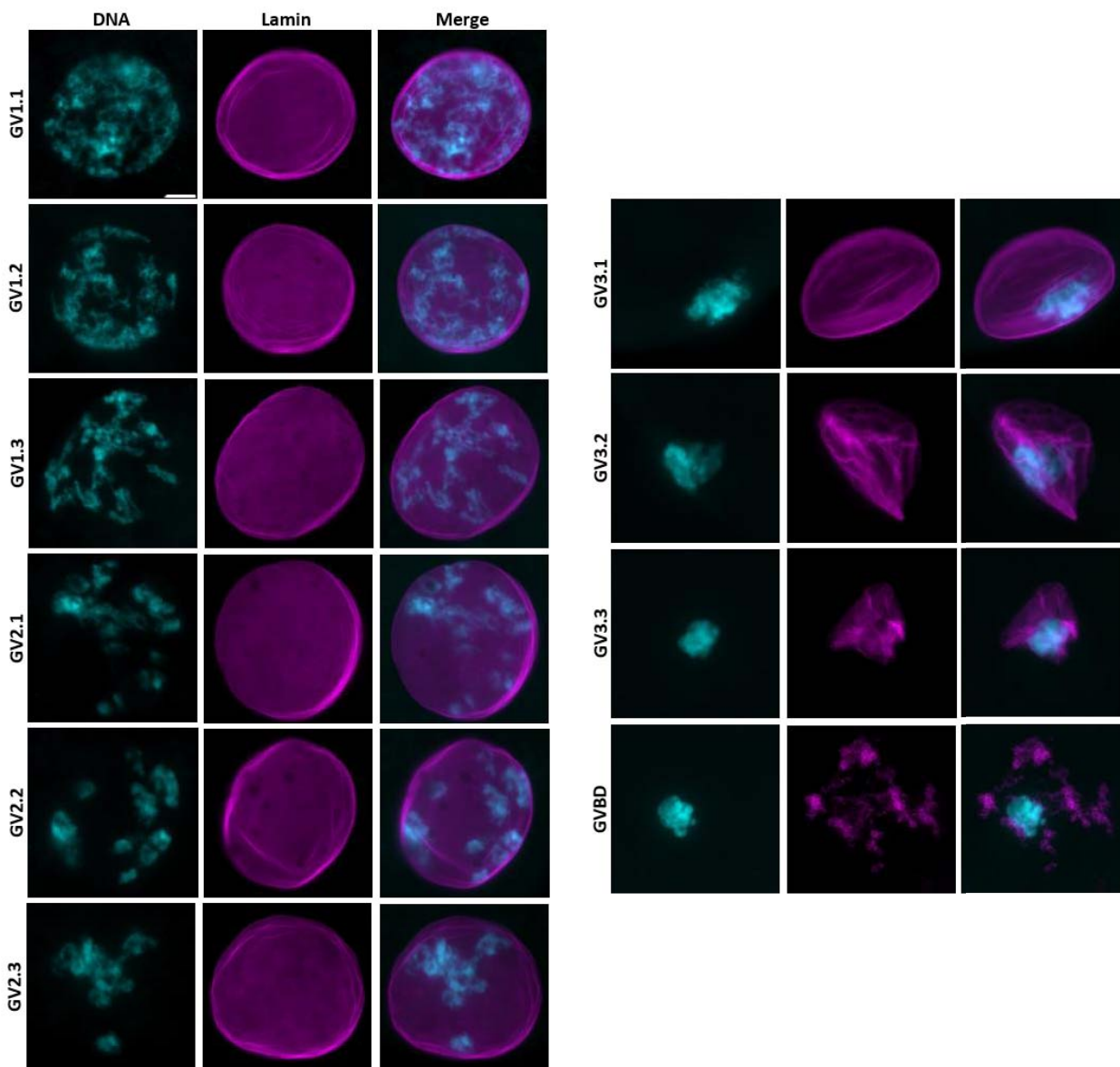


Figura 7 – Imagens representativas de vesículas germinativas de oócitos imaturos em diferentes estágios de desenvolvimento, classificados de acordo com o sistema refinado proposto no presente estudo. O envelope nuclear foi marcado através de protocolo de imunocitoquímica anti-Lamin A/C e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, e a cromatina foi marcada com Hoechst 33342 (as cores foram digitalmente alteradas após a captura das imagens, e as fotos cortadas e aumentadas em zoom digital no software LAS X 3.7.6.25997). Cada estágio de desenvolvimento, ou seja, GV1, GV2 e GV3, foi subdividido em .1, .2 e .3, de acordo com diferenças morfológicas quanto à compactação da cromatina e características físicas do envelope nuclear. As imagens foram adquiridas em objetiva de 63x (barra de escala: 5 μ m).

6.7.3. Visualização e quantificação da densidade de TZPs íntegras às 0h e 9h de MIV

Para avaliar se a pré-MIV e a MIV modificada mantinham a comunicação entre *cumulus* e oócito por mais tempo, em comparação com a MIV controle, a densidade de TZPs íntegras (número de TZPs/10 μm de perímetro) foram quantificados ao final da pré-MIV (momento 0h) e às 9h de MIV. Para isso, COCs foram submetidos a protocolo de coloração com Phalloidin, para marcação de TZPs ricas em actina, e Hoechst 33342 para marcação do DNA. Foram quantificadas TZPs de 27 COCs de COC-0h, 24 COCs de Pm-0h, 22 COCs de Cm-9h, 20 COCs de Mm-9h e 16 COCs de Pm-Mm-9h. COCs foram submetidos a leves pipetagens em gotas de 0,1% PBS-PVP para retirada do excesso de células do *cumulus*, e então fixados em solução 4% paraformaldeído durante 15 min. Após fixação, os COCs foram lavados três vezes em 0,1% PBS-PVP e armazenados na mesma solução a 4°C até a realização do protocolo de coloração. Este protocolo consistiu de uma etapa de 10 min em PBS acrescido de 0,1% Triton x-100 e 1% BSA, seguida por uma etapa de permeabilização por 30 min em PBS com 1% Triton x-100, lavagem por 10 min, e incubação por 30 min em solução de ActinGreen 488 Phalloidin em PBS (1:200, Molecular Probes) protegidos da luz. Após a incubação em Phalloidin, os COCs passaram por três lavagens de 10 min cada, e uma incubação por 30 min em solução de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Hoechst 33342 em PBS (1:1000, Invitrogen). Após uma lavagem final de 20 min, os COCs foram distribuídos em 20 μL de ProLong Gold Antifade (Life Technologies, Thermo Fisher), e cobertos por lamínula.

Em uma segunda etapa do estudo, avaliou-se se COCs ao final da pré-MIV, em estágios diferentes de GV, possuíam diferenças quanto a essa densidade de TZPs. Para isso, 60 COCs do grupo Pm-0h e 20 do grupo COC-0h foram submetidos à técnica de imunocitoquímica anti-Lamin para visualização da vesícula germinativa (descrito no item 6.7.3) acrescida das colorações com Phalloidin e Hoechst 33342. Nessa análise, foi utilizado o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo Alexa Fluor 594 (1:500 em PBS, A11005).

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Leica SP5 em objetiva de 63x, com comprimentos de onda de excitação/emissão de 488/496 nm para AF 488, 590/618 nm para AF 594 e 352/454 nm para Hoechst. A quantificação do número de TZPs íntegras foi realizada com o software Fiji (National Institutes of Health, Bethesda, MD) de acordo com protocolo de Abbassi *et al.* (2021). Brevemente, a imagem de cada oócito foi transformada em 16-bit e uma seção exterior à zona pelúcida foi selecionada e transformada em um plano linear com a ferramenta *Polar transformer*. Uma linha foi traçada dentro da extensão da zona pelúcida, e com a ferramenta

Plot profile obteve-se o número total de *plots*. Para descontar o valor do *background*, traçou-se uma linha com pelo menos 10 pixels de comprimento em três regiões da zona pelúcida que não contivessem TZPs, e de cada região escolheu-se o maior valor de *plot*, fazendo-se a média desses três valores. Para contabilizar o número de TZPs foi utilizada a ferramenta “CONTE.SE”, e considerou-se uma TZP cada valor de *plot* cuja leitura tenha sido maior que as dos *plots* imediatamente adjacentes e maior que a média do *background*. Para o cálculo da densidade de TZPs, foi mensurado o perímetro de cada oócito, e dividida a soma total de TZPs de cada um deles por seus respectivos perímetros.

6.7.5. Ensaio de atividade transcricional em oócitos ao final do protocolo de pré-MIV

Com o intuito de avaliar se os oócitos mantidos em estágio GV1 ao final da pré-MIV possuíam atividade transcricional, foi realizado ensaio para marcação de RNAs nascentes e coloração com Hoechst 33342 em 287 oócitos do grupo Pm-0h. O ensaio foi realizado utilizando o Click-iT™ RNA Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante, com adaptações. Às 5h de pré-MIV, os COCs foram transferidos para um novo poço contendo 500 µL de meio pré-MIV suplementado com 1 mM 5-etinil-uridina (5-EU). RNAs sintetizados entre 5h e 9h de pré-MIV receberam uridina marcada em sua composição. Ao final do protocolo, os oócitos foram completamente desnudados, fixados, permeabilizados e lavados conforme descrito no item 6.7.3. O oócitos foram incubados durante 30 min, protegidos da luz, com coquetel de reação do kit contendo 100 mM de Tris (pH 8,5), 1 mM de CuSO₄, 100 mM de ácido ascórbico e 50 µM de azide fluorescente (Alexa Fluor 488), que reage com a 5-EU. Ao final a incubação, as amostras foram lavadas uma vez em 1 mL do tampão de lavagem do kit e três vezes com 0,1% PBS-PVP. Os oócitos foram então incubados com Hoechst 33342 (10 µg/mL) e lavados em seguida por 10 min, antes de serem montados sobre lâmina em 20 µL de ProLong Gold Antifade e cobertos com lamínula. As imagens foram adquiridas em objetiva de 63x em microscópio invertido de fluorescência Leica DMI8 com Sistema de Imagem Thunder. Como controle positivo, fibroblastos de embrião de camundongo foram cultivados sobre lamínulas, suplementados com 5-EU por 4h ou 24h, e submetidos ao mesmo protocolo de reação. Como controle negativo foram utilizados oócitos submetidos ao protocolo de reação, mas que não receberam suplementação de 5-EU nas últimas 4h de pré-MIV. Os oócitos foram classificados em GV1-GV3 (a ausência de marcação da vesícula germinativa não permitiu a separação entre GV3 e GVBD). Atividade transcricional foi considerada positiva quando observado um padrão

intenso e característico de marcações fluorescentes da região nuclear. Na ausência dessa marcação, o oócito foi considerado transcricionalmente inativo ao final da pré-MIV.

6.7.2. Morfometria da expansão das células do *cumulus* às 0h, 9h e 19h de MIV

Para mensurar e comparar se a pré-MIV e a MIV modificada teriam efeito sobre a expansão das células do *cumulus*, evento marcador de qualidade oocitária, 10 COCs por grupo experimental foram cultivados em gotas de 30 μ L de meio de pré-MIV ou MIV (de acordo com o grupo), e tiveram suas imagens capturadas nos momentos 0h, 9h e 19h de MIV. Imagens de cinco replicatas biológicas por grupo foram obtidas em microscópio invertido Nikon TI Eclipse (Nikon Instruments), em objetiva de 4x. A morfometria da expansão do *cumulus* foi avaliada com o auxílio do software Fiji. As áreas em torno do *cumulus* de cada oócito foram mensuradas e comparadas entre os grupos dentro do mesmo horário.

6.7.6. Análise estatística

Os resultados de quantidade relativa de TZPs e de taxas de expansão de *cumulus* foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey para comparações entre os grupos. A análise da distribuição dos estágios de GV entre COC-0h e Pm-0h foi feita utilizando PROC univariante do SAS, levando-se em consideração parâmetros como média, mediana, moda, curtose e assimetria. As taxas de maturação foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado. As médias normalizadas de CRT (ciclo relativo de *threshold*) foram transformadas logaritmicamente e testadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Para todas as avaliações foi considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6.8. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.

6.8.1. Imunodeteção e quantificação da proteína ZFP36L2 às 9h e 19h de MIV

Para inicialmente confirmar se o anticorpo primário de camundongo anti-ZFP36L2 (Santa Cruz Biotechnology, SC365908) era funcional em protocolo de IF, fibroblastos de embrião de camundongo foram cultivados sobre lamínula e realizada a IF com grupos incubado (controle positivo do teste) e não incubado (controle negativo) com o anticorpo anti-ZFP36L2. Após o resultado do teste se mostrar positivo, IF (conforme descrito item 6.7.3) foi realizada em 39 oócitos desnudos do grupo Cm, 44 do grupo Mm, e 49 do grupo Pm-Mm às 9h de MIV, e em 27 oócitos MII do grupo Cm, 38 MII do grupo Mm e 30 MII de Pm-Mm às 19h de MIV. As diluições empregadas de anticorpo primário (Santa Cruz Biotechnology, SC-365908) e secundário (cabra anti-camundongo Alexa Fluor 488, Thermo Fisher, A11001) foram 1:200. Ao final, os oócitos foram incubados com Hoechst 33342 por 30 min, lavados e montados em lâmina, conforme descrito no item 6.7.3. Dentro de cada grupo e momento avaliado, de 7 a 10 oócitos foram submetidos ao protocolo excluindo-se o anticorpo primário da solução de incubação *overnight* (controle negativo). As imagens foram adquiridas em objetiva de 63x em microscópio invertido de fluorescência Leica DMI8 com Sistema de Imagem Thunder. A quantificação da intensidade de fluorescência foi realizada com o software Fiji. A imagem de cada oócito foi transformada para escala de cinza (8-bit), e marcada a área do oócito com a ferramenta correspondente. A mensuração da intensidade obtida em razão da área do oócito (densidade integrada) foi submetida a dois fatores de correção, baseados na equação “CTCF (*corrected total cell fluorescence*) = Densidade integrada – (área do oócito x média das leituras de *background*)”. Na primeira correção (CTCF1), foi feita a leitura de 5 regiões em torno de cada oócito, eliminando-se da densidade integrada quaisquer valores correspondentes a *background* de lâmina e de ligação inespecífica do anticorpo secundário na região da zona pelúcida. Na segunda correção (CTCF2), empregou-se o valor de CTCF1 no campo “densidade integrada”, e a média das leituras dos oócitos do controle negativo no campo “médias das leituras de *background*”, excluindo-se a média de autofluorescência dos oócitos de um grupo experimental dos valores de fluorescência, correspondentes à ZFP36L2, do oócito do mesmo grupo. Cada grupo experimental e momento avaliado teve seu grupo controle negativo correspondente.

6.8.2. Quantificação da proteína ZFP36L2 por *western blotting*

Para quantificação de ZFP36L2 por *western blotting*, foram utilizados pools de 50 oócitos desnudos por grupo experimental e por replicata biológica, com 10 replicatas no momento 9h e 7 replicatas no momento 19h de MIV (estágio de MII). Oócitos foram completamente desnudados do *cumulus* com ponteira *stripper*, acondicionados em tubos de 600 μ L em volume mínimo de líquido, imersos em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C . A cada amostra foi adicionado 7,5 μ L de tampão de lise RIPA, seguidos de 2 ciclos de 5 min a 95°C e 1 min em gelo para lise das células. Em seguida, 2,5 μ L de tampão Laemmli (4X) foi adicionado por amostra, seguido por 5 min a 98°C . As amostras foram colocadas em gel SDS-PAGE de kit comercial Mini-Protean TGX (456-1033, Bio-RAD, Hércules, Califórnia, EUA). A eletroforese foi realizada a 100 V por 70 min, e as proteínas transferidas para membrana PVDF utilizando o Transfer-Blot Turbo Transfer Pack (170-4156, Bio-RAD), em aparelho de transferência semi-seco Trans-Blot Turbo, em programa “mini TGX” por 3 min em constante de 25 V. As membranas foram então bloqueadas em solução com 5% BSA em TBST por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário de camundongo anti-ZFP36L2 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, SC-365908). Após essa etapa, as membranas foram lavadas três vezes por 5 min cada com TBST e então incubadas por 1h com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com HRP (1:2000, Sigma-Aldrich, A0545), em temperatura ambiente. As membranas passaram então por três lavagens em TBST 1X por 5 min cada. Para detecção das bandas, as membranas foram submetidas a reação de quimioluminescência utilizando solução ECL Plus Prime Western Blotting Detection System (Amersham®, Buckinghamshire, UK). A aquisição das imagens e análise da densidade das bandas foram realizadas, respectivamente, com ChemiDoc MP Image System (Bio-RAD) e o software Image Lab 5.1. As quantidades relativas de ZFP36L2, em unidades arbitrárias, foram normalizadas pelo número de oócitos utilizados em cada pool ($n=50$).

6.8.3. Análise estatística

As quantidades relativas de ZFP36L2 por IF e *western blotting* foram testados quanto à normalidade dos dados e submetidos à ANOVA e teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os resultados de CRT normalizados foram transformados logaritmicamente e as médias testadas por ANOVA e teste de Tukey. Foi considerado nível de significância de 5% para todas as análises ($p<0,05$).

7. RESULTADOS

7.1. Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”.

7.1.1. O tratamento com pré-MIV com CNP resulta em menor taxa de MII às 19h, mas aumenta essa taxa às 9h de MIV

A adoção da etapa de pré-MIV com CNP resultou em diminuição da taxa de oócitos em estágio de MII às 19h de MIV (Figura 8). Enquanto as taxas de MII dos grupos submetidos à MIV convencional ($73,19\% \pm 11,97$) e modificada ($79,13\% \pm 8,64$) foram semelhantes entre si, o grupo que passou pela pré-MIV apresentou menor ($p < 0,01$) taxa de MII ($68,37\% \pm 8,35$) às 19h de MIV.

Curiosamente, nas coletas de oócitos desnudos para outras análises desse estudo, passamos a observar a presença de corpúsculos extrusos no grupo Pm-Mm às 9h de MIV. Em razão dos resultados obtidos na análise de distribuição de estágio de GV ao final da pré-MIV, analisamos taxas de MII às 9h de MIV em seis replicatas biológicas diferentes. Não foi observada presença de corpúsculos extrusos em oócitos dos grupos Cm e Mm, enquanto o grupo Pm-Mm apresentou $24,20\% \pm 9,06$ de taxa de MII nesse horário (Figura 8). Dessa forma, a etapa de pré-MIV com CNP antecipou a extrusão do primeiro corpúsculo polar em parte dos oócitos, o que pode ter subestimado a taxa de MII desse grupo às 19h de MIV.

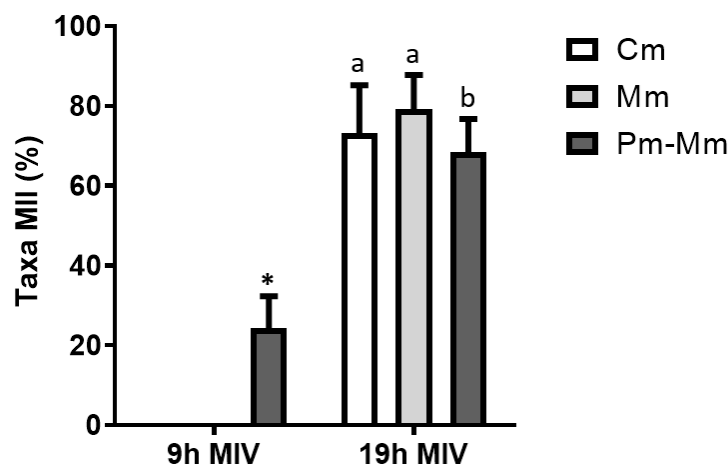


Figura 8 – Taxas de MII (primeiro corpúsculo polar extruso) às 9h e 19h de MIV de COCs maturados em meio convencional (Cm), meio modificado com suplementação de AREG sem pré-MIV (Mm) ou após 9h

de pré-MIV com CNP (Pm-Mm). As barras representam as médias e as barras de erros o erro padrão das médias. Letras diferentes ou asterisco acima das barras representam diferença entre as médias ($p < 0,05$).

7.1.2. A pré-MIV com CNP mantém o bloqueio meiótico em 80% dos oócitos, mas promove uma redistribuição dos estágios de GV

A pré-MIV com CNP se mostrou eficiente em manter o bloqueio meiótico em cerca de 80% dos oócitos no final do protocolo (Figura 9.D e E). No entanto, a adição dessa etapa resultou em uma redistribuição ($p < 0,05$) das categorias de GV na população de oócitos, de uma população inicial com predominância de oócitos GV2 (Figura 9.A), para aumento nas categorias de GV1 e GV3 ao final da pré-MIV (Figura 9.B). Em 247 oócitos do grupo COC-0h foram classificados 18,87% GV1, 55,05% GV2, 22,27% GV3 e 0,81% GVBD; em 139 oócitos PM-0h foram observados 34,53% GV1, 16,54% GV2, 29,05% GV3 e 19,42% GVBD (Figura 9.E).

Quando se analisa essa redistribuição sob o prisma da classificação refinada proposta neste estudo (em que cada categoria de GV é subdividida em .1, .2 e .3), foi possível observar um aumento pronunciado de oócitos nas categorias GV3.3 e GVBD ao final da pré-MIV, enquanto as categorias GV2.2 e 2.3 apresentaram redução (Figura 9.C; D; E). Curiosamente, as subcategorias de GV1 também aumentaram ao final da pré-MIV, em particular GV1.3 (Figura 9.C; D; E). As categorias a partir de GV2.2 aparentemente progrediram na condensação da cromatina ao longo das 9h de pré-MIV, o que resultou no “escape” do bloqueio meiótico daqueles oócitos em estágio mais avançados de GV (Figura 9.C; D; E).

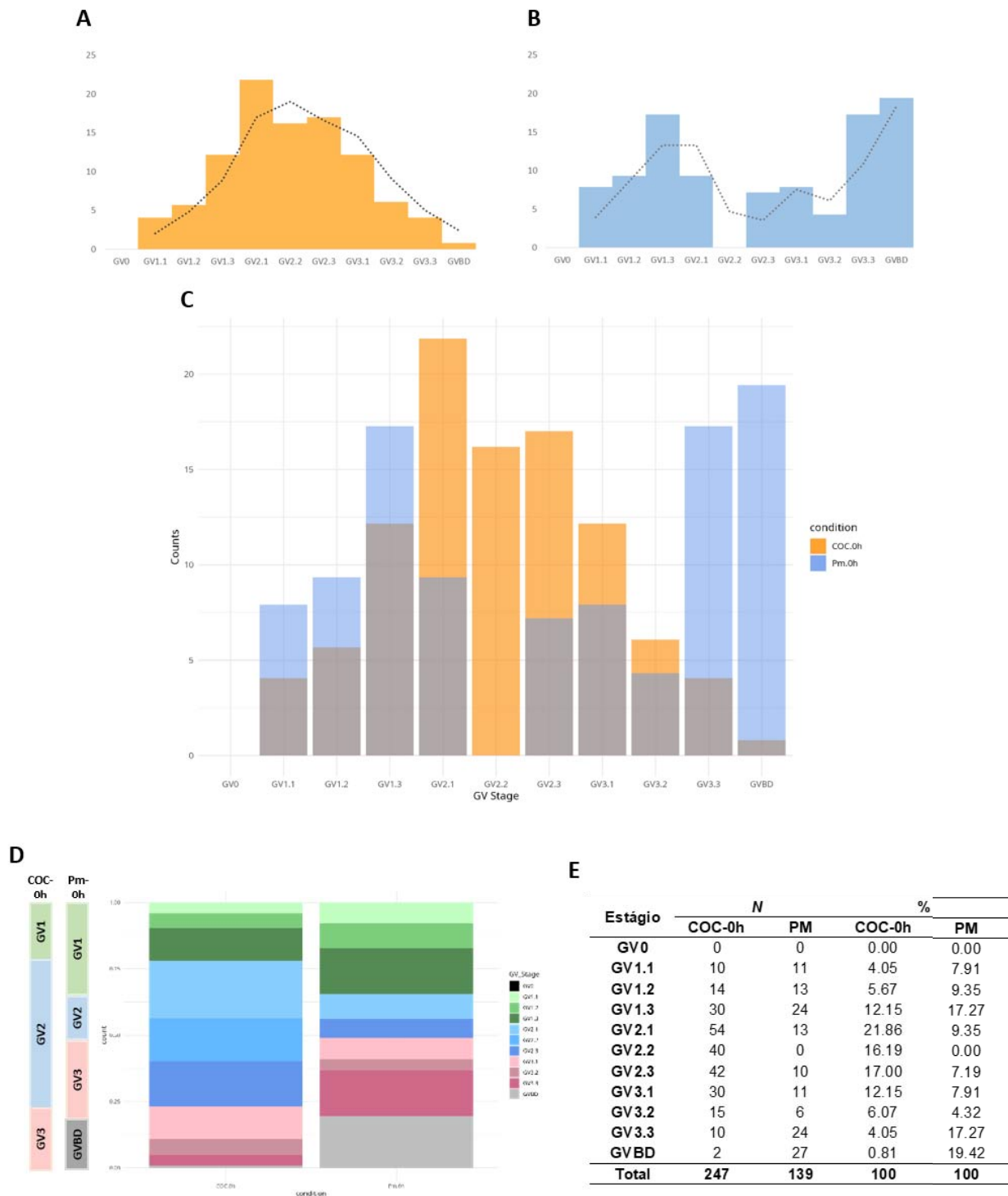


Figura 9 – Distribuição dos estágios de desenvolvimento (GV) em oócitos imaturos (A) e ao final de 9h de pré-MIV com CNP (B), de acordo com o sistema refinado de classificação. As diferenças nos padrões de distribuição de GV entre as duas populações também estão demonstradas no histograma de densidade de frequência (C) e no gráfico de barras empilhadas (D). Foram classificados 247 oócitos COC-0h e 139

oócitos Pm-0h. O número total e a porcentagem de oócitos por categoria de GV encontram-se demonstrados na tabela (E).

7.1.3. A pré-MIV com CNP modula diferencialmente a comunicação no COC, em função do estágio de GV do oócito

O objetivo dessa análise foi verificar o efeito da pré-MIV e/ou da MIV modificada sobre a comunicação entre *cumulus* e oócito, avaliada quanto à densidade de TZPs íntegras (Figura 10). A MIV modificada com AREG induziu diminuições na densidade de TZPs íntegras às 9h de MIV (Figura 11). As médias de TZP/10 μm nos grupos Mm e Pm-Mm foram respectivamente de $2,97 \pm 0,67$ e $2,95 \pm 0,67$, 12% e 13% menores ($p < 0,05$) que as dos grupos controle imaturo (COC-0h; $3,39 \pm 0,80$ TZPs/10 μm) e controle MIV (Cm; $3,39 \pm 0,57$ TZPs/10 μm). A densidade de TZPs íntegras de COCs ao final da pré-MIV com CNP ($3,32 \pm 1,02$ TZPs/10 μm) não diferiu de nenhum outro grupo, seja às 0h ou 9h de MIV (Figura 11).

Apesar de não ter diferido de nenhum dos outros grupos nessa primeira análise, distribuição dos dados do grupo Pm-0h no gráfico (Figura 11) chamou a atenção, sugerindo que ao final da pré-MIV poderiam estar sendo formadas duas subpopulações com densidades de TZPs distintas. Após a obtenção dos resultados da análise de distribuição dos estágios de GV às 9h de pré-MIV, decidimos quantificar e comparar a densidades de TZPs em função do estágio de GV (GV1, 2, 3 e GVBD, de acordo com a classificação tradicional; Figura 12) ao final da pré-MIV, e comparar com o controle imaturo. A pré-MIV teve um efeito geral na diminuição da densidade de TZPs ($p = 0,0005$, Figura 13). Não houve diferença entre a densidade de TZPs íntegras, em função do estágio de GV, entre COCs imaturos ($3,78 \pm 0,10$ para GV1, $4,14 \pm 0,40$ para GV2, e $3,81 \pm 0,52/10 \mu\text{m}$ para GV3) (Figura 13). Dentro do grupo pré-maturado, COCs do estágio GV3 mostraram menor densidade de TZPs ($3,10 \pm 0,64/10 \mu\text{m}$) comparados com GV1 ($3,64 \pm 0,59/10 \mu\text{m}$; $p = 0,00098$) (Figura 13). Nessa análise não foi possível empregar o sistema de classificação refinada, devido à dificuldade de diferenciar as subcategorias de GV1. Apesar de numericamente também ter apresentado menor densidade de TZPs, a categoria GVBD não apresentou diferença dos demais grupos, provavelmente pelo número baixo de amostras analisadas nessa categoria.

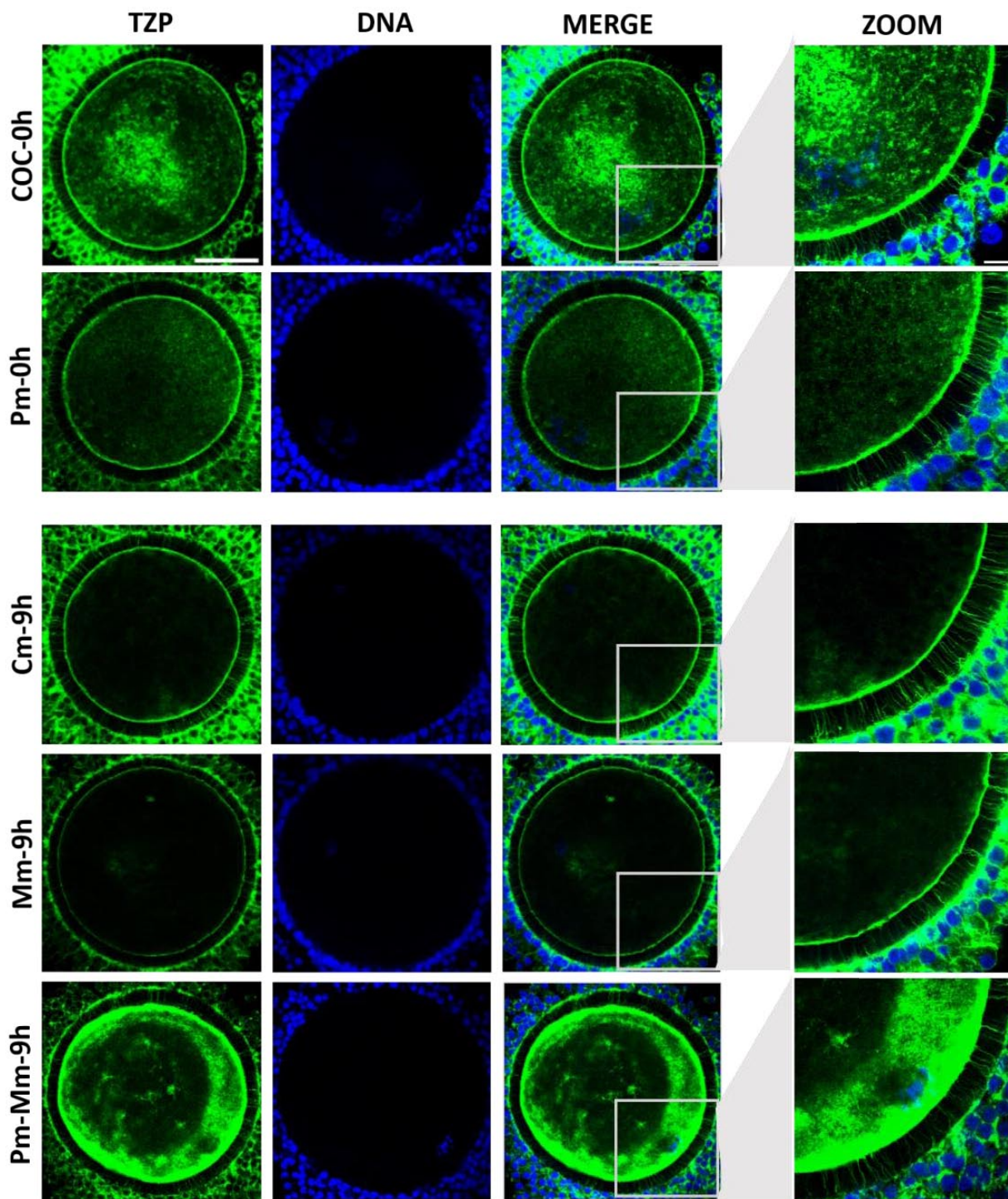


Figura 10 – Análises de microscopia confocal de COCs às 0h (grupos imaturo e pré-maturado) e às 9h de MIV (MIV controle, MIV modificada e pré-MIV com MIV modificada), para visualização e quantificação de TZPs íntegras. As TZPs foram marcadas com Actin Green 488 Phalloidin e o DNA com Hoechst 33342. Imagens adquiridas em objetiva de 63x (barra de escala: 50 μ m). À direita, zoom digital para mostrar em detalhes as TZPs (barra de escala: 10 μ m).

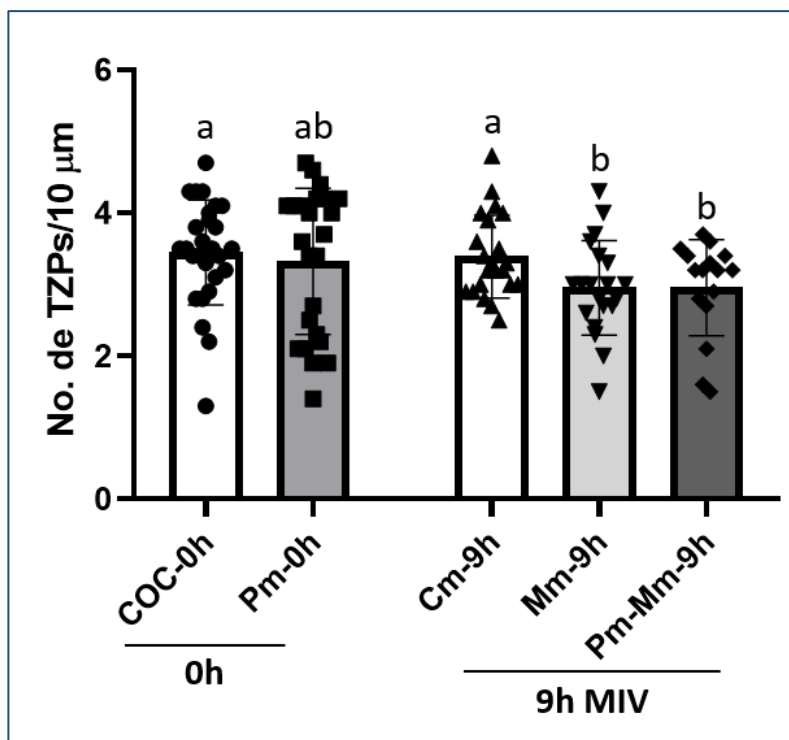


Figura 11 – Número relativo de TZPs íntegras (n/10 μm) às 0h e às 9h de MIV, comparando-se COCs imaturos (COC-0h), ao final da pré-MIV com CNP (Pm-0h), e COCs maturados em meio convencional (Cm), meio modificado sem pré-MIV (Mm) ou após 9h de pré-MIV com CNP (Pm-Mm). Letras diferentes acima das barras representam diferença ($p < 0,05$).

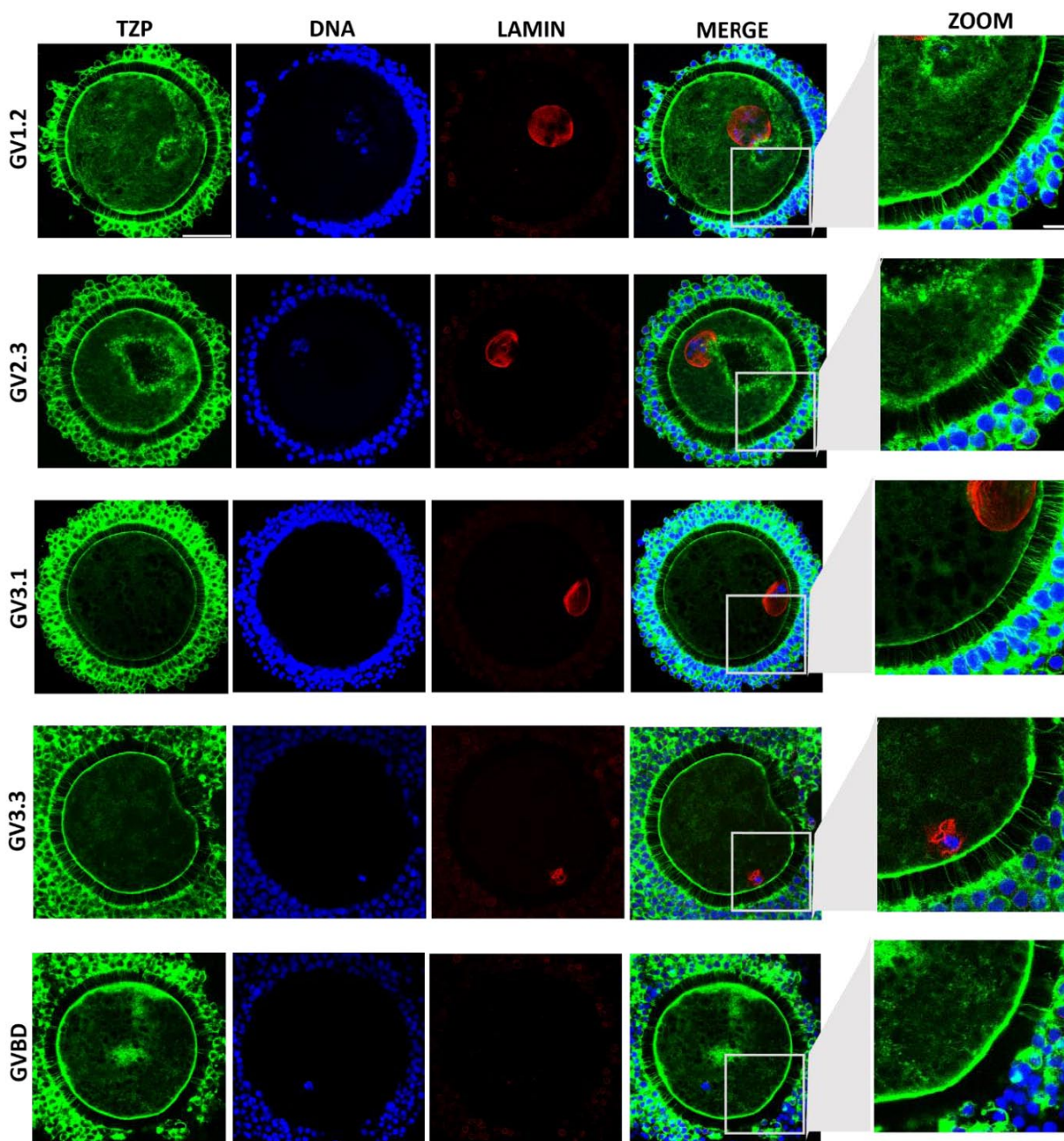


Figura 12 – Análises de microscopia confocal para quantificação de TZPs íntegras e classificação quanto ao estágio de desenvolvimento em COCs ao final das 9h de pré-MIV com CNP. As TZPs foram marcadas com Actin Green 488, o DNA por Hoechst 33342 e a vesícula germinativa por Alexa Fluor 594. As imagens foram adquiridas em objetiva de 63x (barra de escala: 50 µm). À direita, zoom digital para mostrar em detalhes as TZPs (barra de escala: 10 µm).

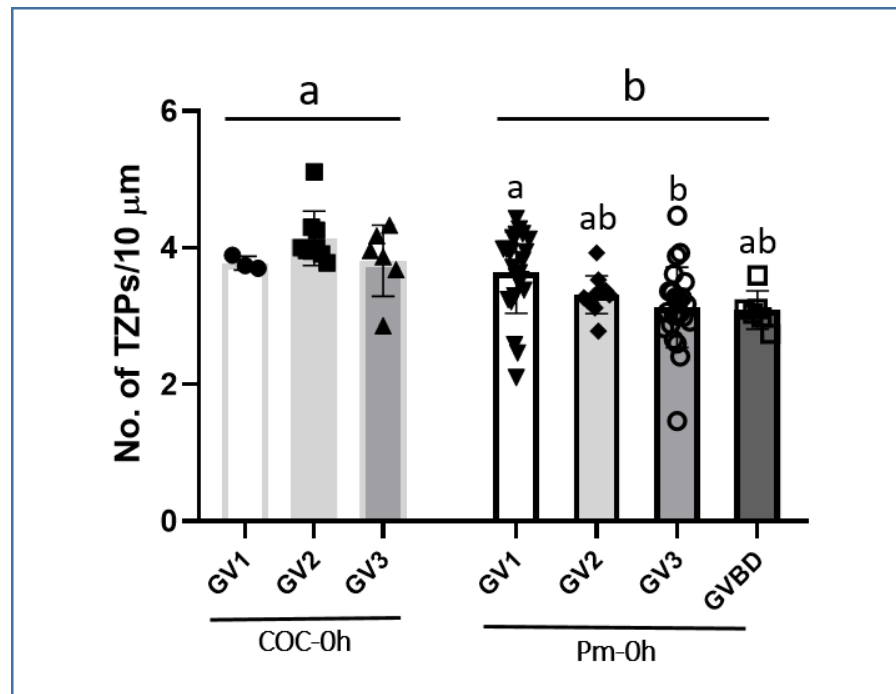


Figura 13 – Número relativo de TzPs íntegras de oócitos imaturos (COC-0h), e ao final de 9h de pré-MIV com CNP (Pm-0h), classificados de acordo com estágio de desenvolvimento (classificação tradicional). Letras diferentes acima das barras representam diferença ($p < 0,05$).

7.1.4. A expressão de *ERK2* e *PRKACA*, genes associados à retomada da meiose e retração de TzPs, é aumentada nos grupos da pré-MIV e MIV modificada

A pré-MIV com CNP induziu aumento nas expressões de *ERK2* ($p < 0,0001$, *fold-change* 1,7) e *PRKACA* ($p = 0,0003$, 1,8 *fold*) nas células do *cumulus* de COCs submetidos a essa etapa (Figura 14). Às 9h de MIV, ambos os grupos da MIV modificada apresentaram maiores expressões desses dois genes, comparados ao grupo maturado em meio controle ($p = 0,0032$, 1,4 *fold* para *ERK2*; $p = 0,0013$, 1,3 *fold* para *PRKACA*). Em células do *cumulus* de oócitos MII (19h de MIV), não houve diferença na expressão de *ERK2* entre os grupos, enquanto *PRKACA* se manteve mais expresso ($p < 0,0001$, 1,4 *fold*) no grupo MIV modificada sem pré-maturação (Figura 14).

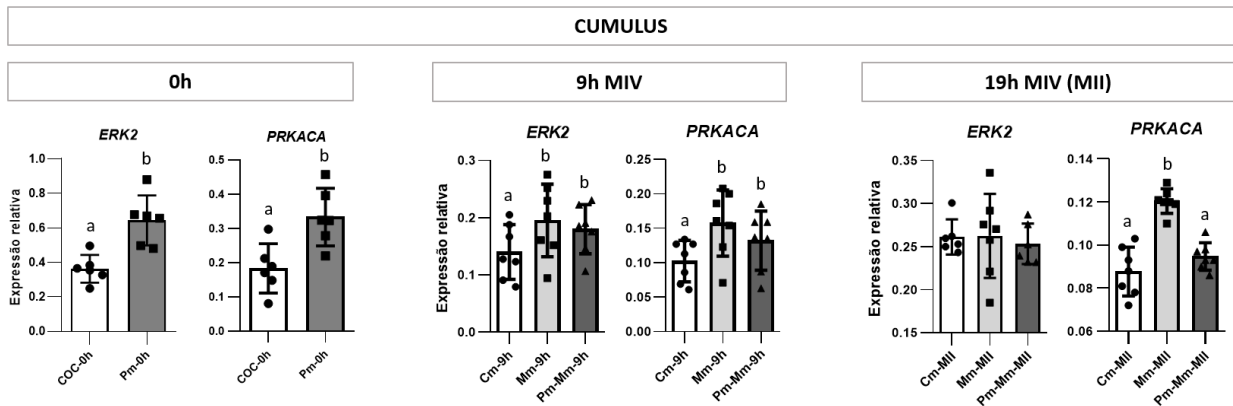


Figura 14 – Expressão relativa de *ERK2* e *PRKACA* em células do *cumulus* dos grupos imaturo (COC-0h), e pré-maturado (Pm-0h), e de MIV controle (Cm), MIV modificada (Mm) e MIV modificada após a etapa de pré-MIV (Pm-Mm) às 9h e 19h de MIV (estágio de MII). Letras diferentes acima das barras representam diferença ($p < 0,05$).

7.1.5. Uma pequena proporção de oócitos em estágio de GV1 se mantém transcricionalmente ativa ao final da pré-MIV com CNP

Com o intuito de verificar se essa população aumentada de oócitos GV1 apresentava atividade transcricional ao final da pré-MIV, realizamos um ensaio de marcação de RNA nascente com 5-EU e analisamos em microscópio de fluorescência. Utilizamos fibroblastos de embrião de camundongo como controle positivo e oócitos do mesmo grupo experimental que não receberam suplementação com 5-EU como controle negativo (Figura 15). De 287 oócitos analisados ao final da pré-MIV, apenas 19 (6,62%) apresentaram marcação fluorescente característica (imagens representativas na Figura 15), ou seja, sintetizaram RNAs contendo 5-EU nas últimas 4h de pré-MIV (Tabela 5). Dos 86 oócitos classificados tradicionalmente como GV1, 13 (15,12%) foram classificados como transcricionalmente ativos nas últimas horas de pré-MIV (Tabela 5).

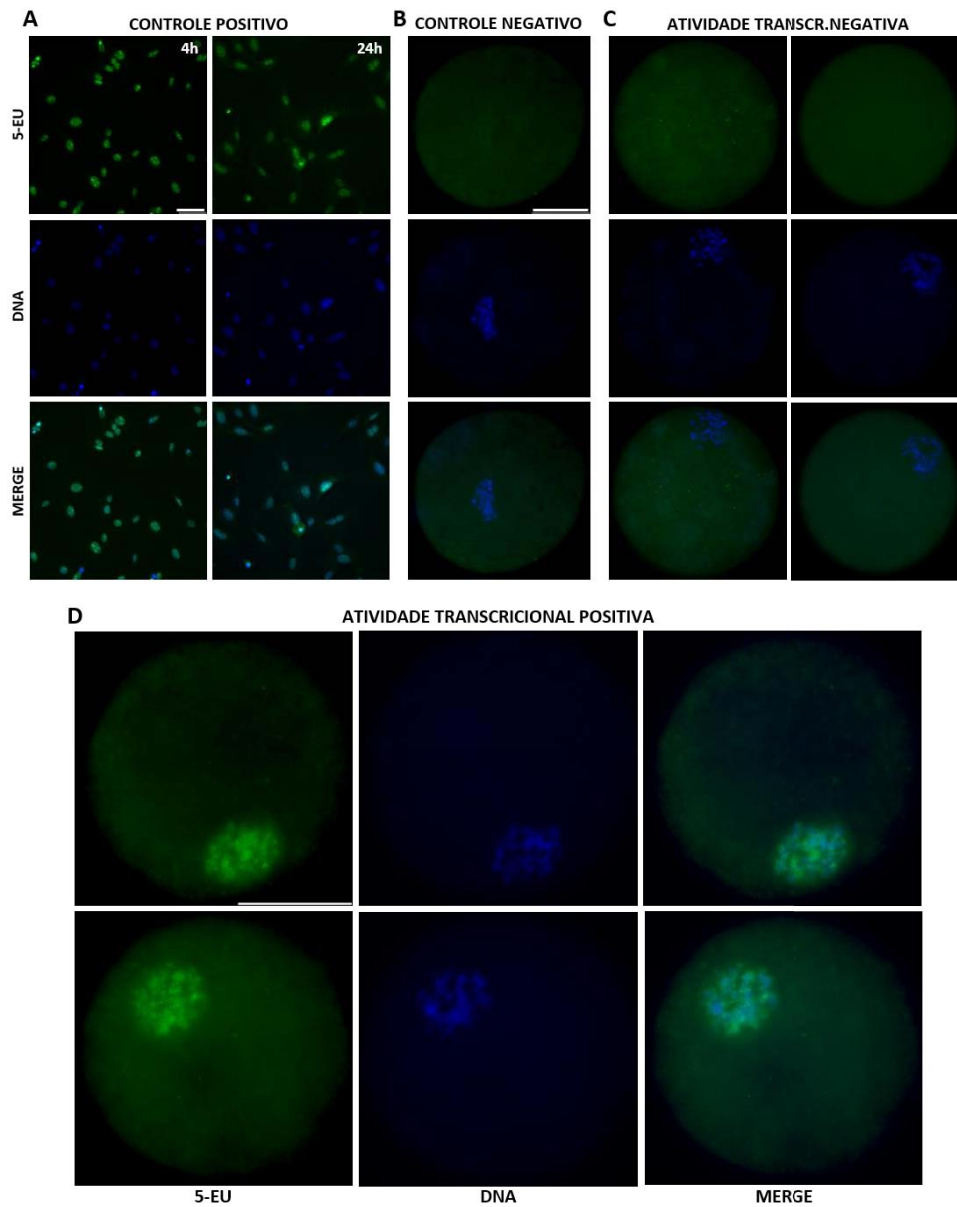


Figura 15 – Ensaio de atividade transcricional em oócitos ao final da pré-MIV com CNP. COCs foram suplementados com 5-EU durante as últimas 4h de pré-MIV e submetidos à reação de Click-iT para marcação fluorescente de RNAs sintetizados durante esse período. Fibroblastos de embriões de camundongo foram suplementados com 5-EU por 4h ou 24h e utilizados como controle positivo (A); oócitos sem suplementação de 5-EU foram utilizados como controle negativo (B). Os oócitos foram classificados como atividade negativa (C) ou positiva (D), quando um padrão de intensidade fluorescente característico foi observado na região da cromatina (marcada com Hoechst 33342). As imagens foram adquiridas em objetiva de 63x (escala: 50 μ m). Imagens A: 20x, escala 50 μ m).

Tabela 5 – Número total de oócitos, número de oócitos positivos (transcricionalmente ativos) e porcentagem de positivos de acordo com o estágio de GV (classificação tradicional), ao final da pré-MIV com CNP.

Estágio	n Total	n Positivos	% Positivos (Class. Tradicional)
GV1	86	13	15.12
GV2	61	5	8.20
GV3	140	1	0.71
Total	287	19	6.62

Esses resultados apresentaram novas informações quando a classificação foi feita de acordo com o sistema refinado proposto neste estudo. Dentre 86 oócitos em estágio GV1, 41 (47,67%) foram classificados como GV1.1, 19 deles (22,09%) como GV 1.2, e 26 (30,24%) como GV1.3. Entretanto, dentre os classificados como transcricionalmente positivos, a maior parte pertenceu à categoria GV1.3, ou seja, a subcategoria de GV1 que possui maior grau de compactação de cromatina (Tabela 6).

Tabela 6 - Número total de oócitos, número de oócitos positivos (transcricionalmente ativos) e porcentagem de positivos de acordo com o estágio de GV (classificação refinada), ao final da pré-MIV com CNP.

Estágio	n Total	n Positivos	% Positivos (Class. Refinada)
GV1.1	41	2	4.88
GV1.2	19	2	10.53
GV1.3	26	9	34.62
GV2.1	21	2	9.52
GV2.2	15	0	0
GV2.3	25	3	12
GV3.1	44	0	0
GV3.2	24	1	1.39
GV3.3/BD	72	0	0
Total	287	19	

7.1.6. A MIV modificada reduz a expansão das células do *cumulus* e modula diferencialmente a expressão de genes relacionados a esse evento ao longo na MIV

A adoção do meio modificado resulta em diminuição na expansão das células do *cumulus* tanto às 9h quanto às 19h de MIV, seja ela precedida ou não pela etapa de pré-MIV (Figura 16). Não houve diferença na área total ocupada pelas células do *cumulus* entre COCs recém recuperados dos folículos (COC-0h) e COCs ao final de 9h de pré-MIV (Pm-0h), mas às 9h de MIV os grupos submetidos à MIV modificada (Mm e Pm-Mm) apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$), de 25,6% (Mm) e 19,1% (Pm-Mm) na área de expansão do *cumulus* em relação ao grupo controle (Cm). Às 19h de MIV, essas reduções ($p < 0,05$) foram de 40,7% no grupo Mm e de 45,3% no grupo Pm-Mm (Figura 17).

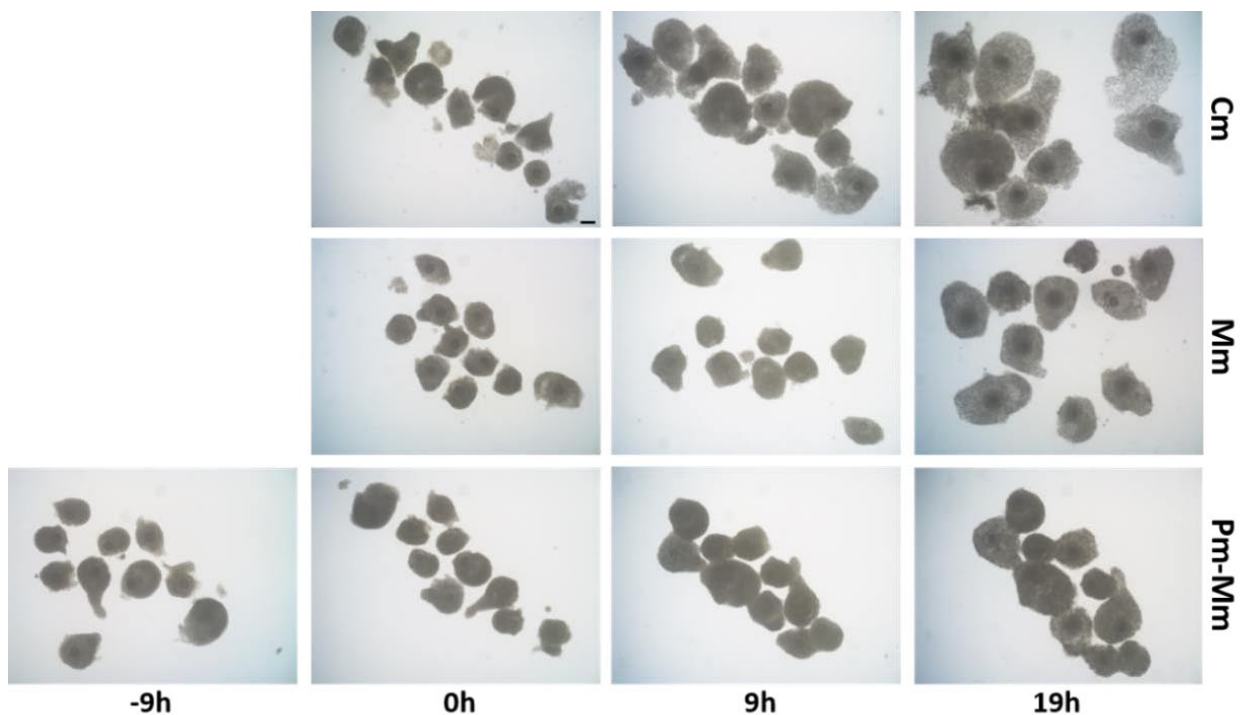


Figura 16 – Imagens representativas da evolução da expansão das células do *cumulus* durante a MIV (nos momentos -9h e 0h imaturos, às 9h e 19h os três grupos de MIV) em COCs maturados em meio convencional (Cm), em meio modificado sem pré MIV (Mm) ou após 9h de pré-MIV com CNP (Pm-Mm).

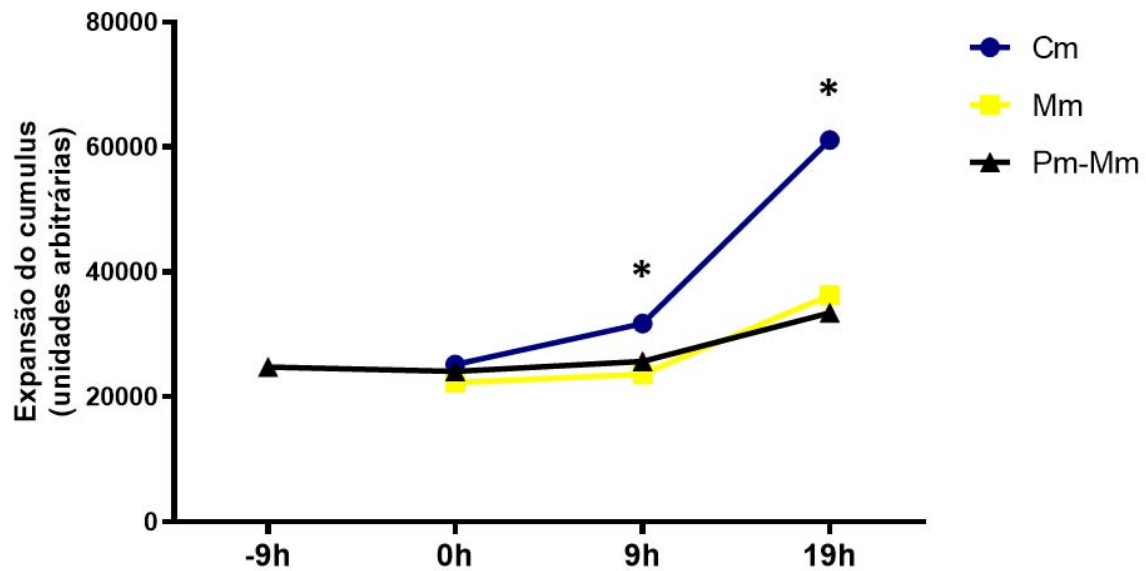


Figura 17 – Morfometria da evolução da expansão das células do *cumulus* durante a MIV (nos momentos -9h e 0h – imaturos – às 9h e 19h de MIV) em COCs maturados em meio convencional (Cm) e meio modificado sem pré-MIV (Mm) ou após 9h de pré-MIV com CNP (Pm-Mm). Asteriscos representam diferença ($p < 0,05$).

A expressão de genes relacionados ao processo de expansão das células do *cumulus* também foi afetada pelo protocolo de MIV modificada. Dos três genes analisados no *cumulus* (*HAS2*, *PTX3* e *TNFAIP6*), a pré-MIV com CNP induziu aumento de expressão ($p = 0,001$, *fold-change* 13,9) apenas de *HAS2* ao final do tratamento, comparado com *cumulus* de oócitos imaturos (COC-0h) (Figura 18).

Às 9h de MIV, o meio modificado resultou em diminuição nas expressões de *HAS2* ($p = 0,0002$, 0,76 *fold* para Mm e 0,32 para Pm-Mm) e *TNFAIP6* ($p < 0,0001$, 0,02 *fold* para Mm e 0,03 para Pm-Mm) nos dois grupos submetidos à MIV modificada. Nesse horário, *PTX3* foi mais expresso ($p = 0,0008$) no grupo que passou pela pré-maturação com CNP (FC 3,0) (Figura 18).

Às 19h de MIV, o mesmo padrão de diminuição de expressão de *HAS2* e *TNFAIP6* foi mantido em células do *cumulus* de oócitos MII dos grupos Mm ($p < 0,0001$, 0,4 e 0,09 *fold* respectivamente) e Pm-Mm ($p < 0,0001$, 0,3 e 0,07 *fold*). O padrão de expressão de *PTX3* foi o oposto, estando mais expresso nos grupos maturados em meio modificado ($p = 0,0003$, 4,7 *fold* para Mm e 7,4 para Pm-Mm) comparados à MIV controle (Figura 18).

Apesar das alterações causadas pelos protocolos de pré-MIV e MIV modificada na expressão gênica no *cumulus*, não foi observada diferença nas expressões de *GDF9* e *BMP15* nos oócitos, seja em função de grupo experimental ou tempo de observação (Figura 18).

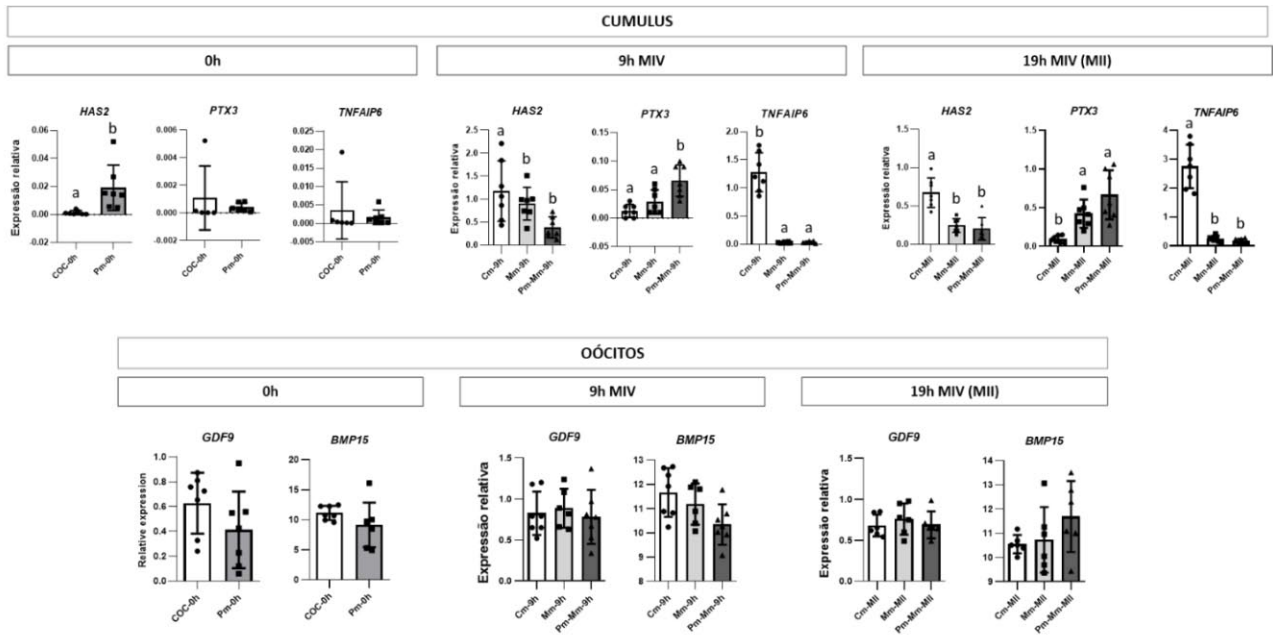


Figura 18 – Expressão relativa de *HAS2*, *PTX3* e *TNFAIP6* em células do *cumulus*, e *GDF9* e *BMP15* em oócitos imaturos e ao final da pré-MIV (0h), e cultivados em meio convencional (Cm), meio modificado com AREG sem pré-MIV (Mm) ou após pré-MIV com CNP (Pm-Mm) às 9h e 19h de MIV (estágio de MII). Letras diferentes acima das barras representam diferença ($p < 0,05$).

7.2. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.

7.2.1. O sistema de MIV altera a expressão de *ZFP36L2* no oócito

O experimento 1 teve por objetivo analisar se o sistema *in vitro* alterava a expressão de dois genes associados ao processo de tradução (*CPEB1* e *CPEB4*) e dois genes pertencentes à maquinaria de degradação de RNAm (*CNOT7* e *ZFP36L2*) nos oócitos. Para isso, avaliamos a expressão desses genes em amostras de oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. Apenas *ZFP36L2* teve sua expressão afetada pela MIV, sendo menos ($p = 0,0083$, 0,67 fold) expresso em oócitos MII *in vitro* comparados aos MII *in vivo* (Figura 19).

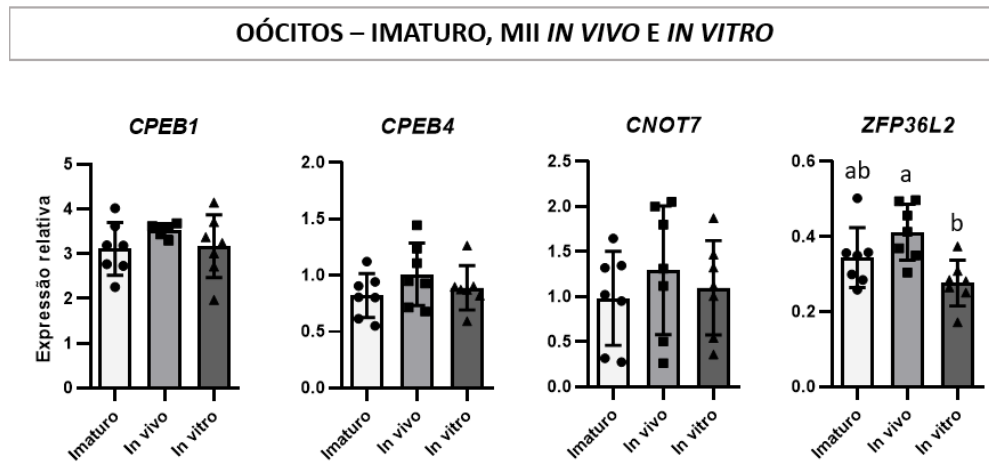


Figura 19 – Expressão relativa de *CPEB1* e *CPEB4* (tradução de RNAm) e *CNOT7* e *ZFP36L2* (degradação de RNAm) em oócitos imaturos, maturados *in vivo* e *in vitro*. Letras diferentes sobre as barras representam diferença ($p < 0,05$).

A partir dos resultados do experimento 1, partiu-se para avaliar se a expressão de *ZFP36L2* nos oócitos seria alterada pelo tipo de protocolo de MIV. As expressões de *CNOT7*, *MAPKAPK2* e *YWHAZ* também foram avaliadas, devido à relação desses genes com a atividade de *ZFP36L2*, assim como os níveis de expressão de *CPEB1* e *CPEB4*, proteínas que regulam a poliadenilação do RNAm de diversos genes durante a maturação, entre eles *ZFP36L2*.

Como a expressão de *ZFP36L2* não foi alterada nos oócitos pré-maturados (Pm-0h) em comparação com os imaturos (Figura 21.A) e só ter apresentado diferença de expressão entre maturados *in vivo* e *in vitro* no experimento 1, optou-se por avaliar a expressão desses genes apenas às 9h e às 19h (MII) de MIV (Figura 20). Às 9h de MIV, apenas *ZFP36L2* apresentou diferença de expressão ($p = 0,026$, 0,8 *fold*), sendo menos expresso em oócitos em meio modificado sem pré-maturação, quando comparados ao controle (Figura 20.A).

Às 19h de MIV, *ZFP36L2* teve seu nível de expressão diminuído ($p = 0,0557$) em oócitos MII que passaram pela pré-MIV (0,7 *fold*) comparados aos oócitos controle. Já para *CPEB1*, a adição da etapa de pré-MIV determinou aumento em sua expressão ($p = 0,0132$, 1,4 *fold*) em oócitos MII apenas quando comparados com os oócitos maturados em meio modificado (Figura 20.B).

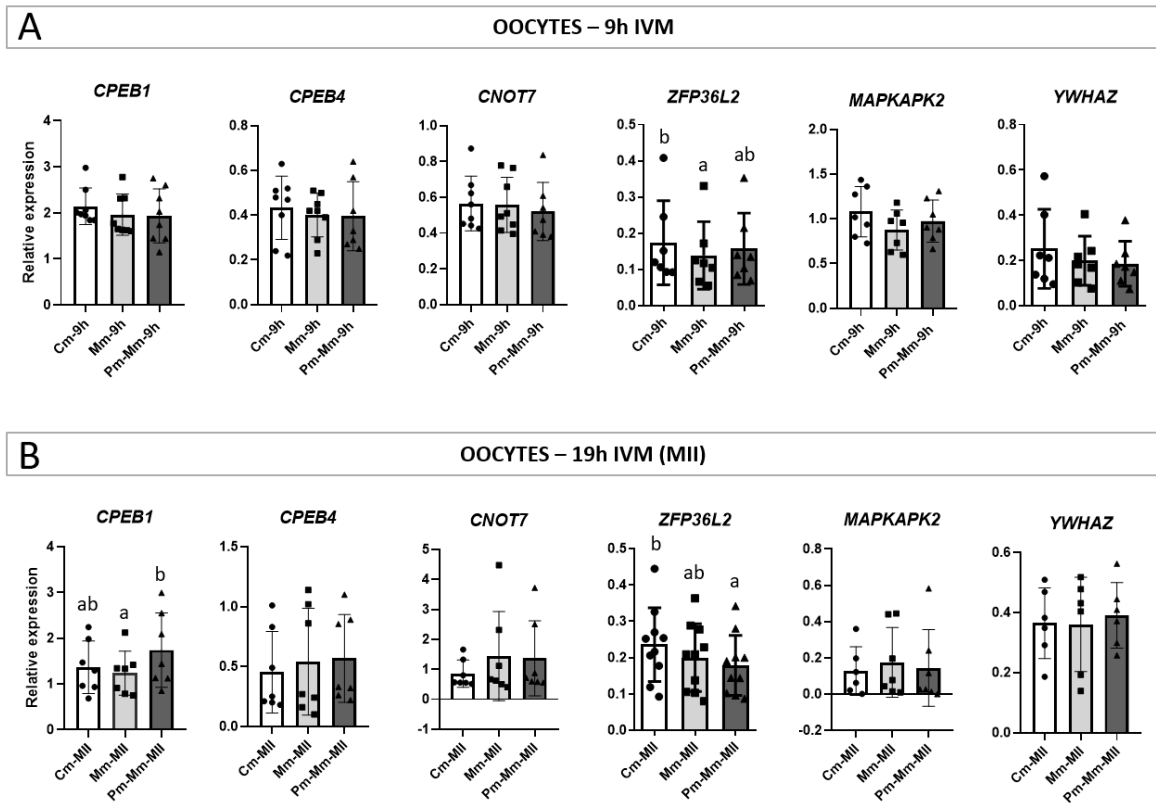


Figura 20 – Expressão relativa de *CPEB1* e *CPEB4* (tradução de RNAm), *CNOT7* e *ZFP36L2* (degradação de RNAm), *MAPKAPK2* e *YWHAZ* (atividade de *ZFP36L2*) em oócitos dos grupos MIV controle (Cm), MIV modificada (Mm) e MIV modificada após pré-MIV (Pm-Mm) às 9h (A) e 19h (estágio MII; B) de MIV. Letras diferentes sobre as barras representam diferença ($p < 0,05$).

7.2.2. Dos alvos de *ZFP36L2*, apenas *KDM4C* tem sua expressão aumentada nos oócitos maturados em MIV modificada, mas sem a etapa de pré-MIV

Em vista das diferenças observadas nas expressões de *ZFP36L2* em oócitos e células do *cumulus* e de alguns genes ligados à sua atividade no *cumulus*, avaliamos os níveis de alguns de seus transcritos-alvo nos oócitos durante a MIV, para verificar se essas diferenças citadas estariam afetando a atividade da proteína *ZFP36L2*. Assim como *ZFP36L2* não teve sua expressão alterada ao final da pré-MIV, também não foram observadas diferenças entre alguns de seus alvos nos oócitos nesse momento de avaliação, conforme ilustrado na Figura 21.B. Dessa forma, essa análise ficou focada nos oócitos às 9h e 19h de maturação *in vitro* (Figura 21.C e D).

Dos 10 genes-alvos escolhidos para avaliação, três (*CCNE1*, *FBXO43* e *FBXO5*) são ligadas a regulação do ciclo celular, e sete são desmetilases de histonas com funções importantes na compactação da cromatina (Figura 21). Dentre os 10 genes, apenas *KDM4C* teve sua expressão alterada pelo protocolo de MIV tanto às 9h quanto às 19h. Às 9h de MIV, a adição da etapa de pré-MIV induziu nos oócitos diminuição ($p=0,0078$, 0,6 *fold*) nos níveis de *KDM4C* comparados aos grupos que foram submetidos diretamente à maturação (Figura 21.C). Às 19h, *KDM4C* foi diferencialmente expresso ($p=0,0058$, 1,6 *fold*) apenas entre MIV modificada e modificada após pré-MIV (Figura 21.D).

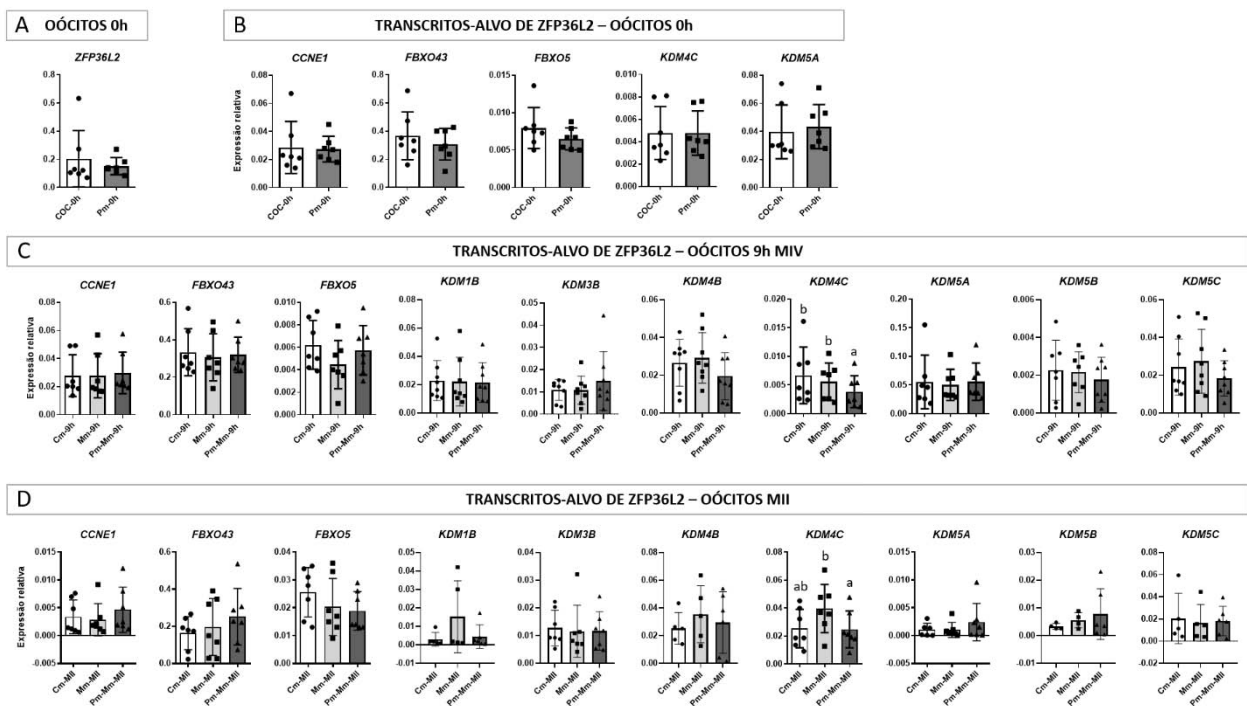


Figura 21 - Expressão relativa de *ZFP36L2* em oócitos às 0h (A), e de alguns de seus alvos em oócitos dos grupos imaturo (COC-0h) e pré-maturado (Pm-0h) (B), e de MIV controle (Cm), MIV modificada (Mm) e MIV modificada precedida por pré-MIV (Pm-Mm) às 9h (C) e 19h (estágio MII; D) de MIV. Letras diferentes sobre as barras representam diferença ($p < 0,05$).

7.2.3. A MIV modificada reduz os níveis da proteína ZFP36L2 nos oócitos, em avaliação feita por técnica de IF

Com o intuito de avaliar se as diferenças observadas na expressão de *ZFP36L2* se refletiam na proteína, quantificamos os níveis de *ZFP36L2* por imunocitoquímica e empregamos o *western blotting* para validação, utilizando o mesmo anticorpo para ambos. No primeiro passo,

testamos a eficiência do anticorpo anti-ZFP36L2 (SC-365908) para as duas técnicas. O anticorpo funcionou na detecção citoplasmática de ZFP36L2 em fibroblastos (controle positivo; Figura 22.B), marcação que esteve ausente nas células submetidas ao protocolo de IF sem adição do anticorpo primário (controle negativo; Figura 22.B). O anticorpo anti-ZFP36L2 também mostrou eficiência no teste do *western blotting*, realizado com pools de 50 e 100 oócitos às 9h de MIV, apresentando bandas no mesmo peso molecular predito da proteína, 36 kDa (Figura 24.A).

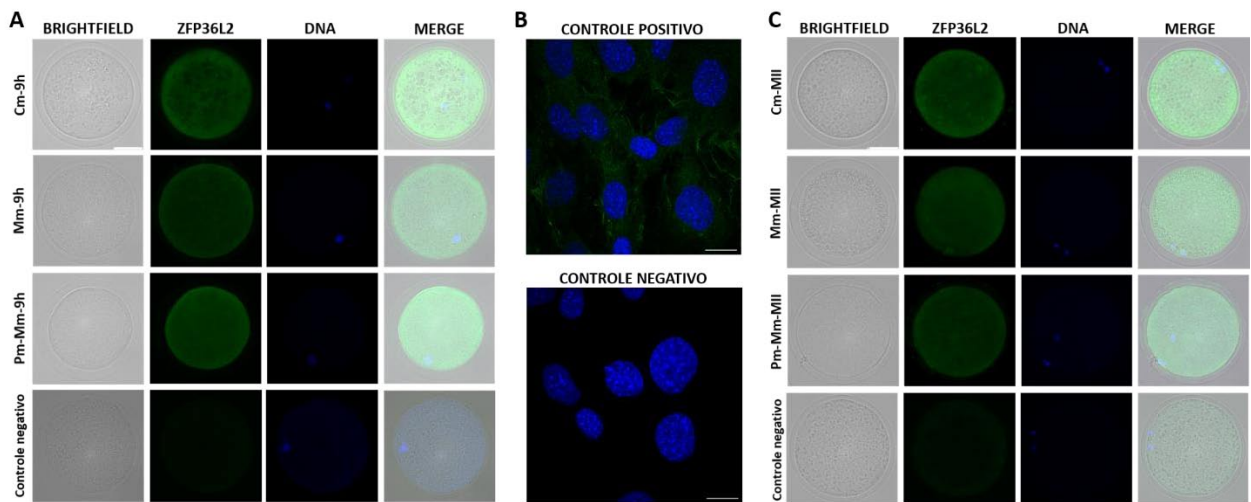


Figura 22 – Imagens representativas da presença da proteína ZFP36L2, marcada com Alexa Fluor 488 (verde) em oócitos dos grupos Cm, Mm e Pm-Mm às 9h (A) e às 19h (estágio MII) de MIV (C). Para grupo experimental, oócitos incubados sem anticorpo primário (imagens ilustrativas na última linha das pranchas) foram utilizados como controle negativo. As imagens foram adquiridas em objetiva de 63x (escala: 50 μ m). Fibroblastos de embrião de camundongo foram utilizados para testar a eficiência do anticorpo na técnica de IF (B). Imagens adquiridas em objetiva de 63x (escala: 20 μ m).

Os resultados de quantificação de ZFP36L2 em oócitos às 9h e 19h (MII) de MIV, analisados por IF, estão demonstrados nos gráficos da Figura 23, e as imagens de oócitos submetidos à técnica estão representadas na Figura 22 (A; C). Às 9h de MIV, uma menor quantificação ($p=0,0003$, 0,85 *fold*) de ZFP36L2 foi observada em oócitos da MIV modificada (Mm), comparado com os outros dois grupos (Cm e Pm-Mm) (Figura 23.A), um padrão similar ao observado na expressão de *ZFP36L2* no respectivo horário (Figura 22.A).

Em oócitos MII às 19h, os níveis proteicos de ZFP36L2 foram diferentes ($p<0,0001$) entre todos os grupos, estando em maiores valores no grupo controle, valores intermediários na MIV modificada (0,82 *fold*), e em menores valores nos oócitos que passaram pela etapa de pré-MIV

(0,65 *fold*) (Figura 23.B). Também nesse horário, o padrão de expressão proteica de ZFP36L2 foi semelhante ao observado na expressão de seu RNAm (Figura 20.B). Foram mensurados 39 oócitos do grupo Cm, 44 do grupo Mm, e 49 do grupo Pm-Mm às 9h de MIV, e 27 oócitos MII do grupo Cm, 38 MII do grupo Mm e 30 MII de Pm-Mm às 19h de MIV.

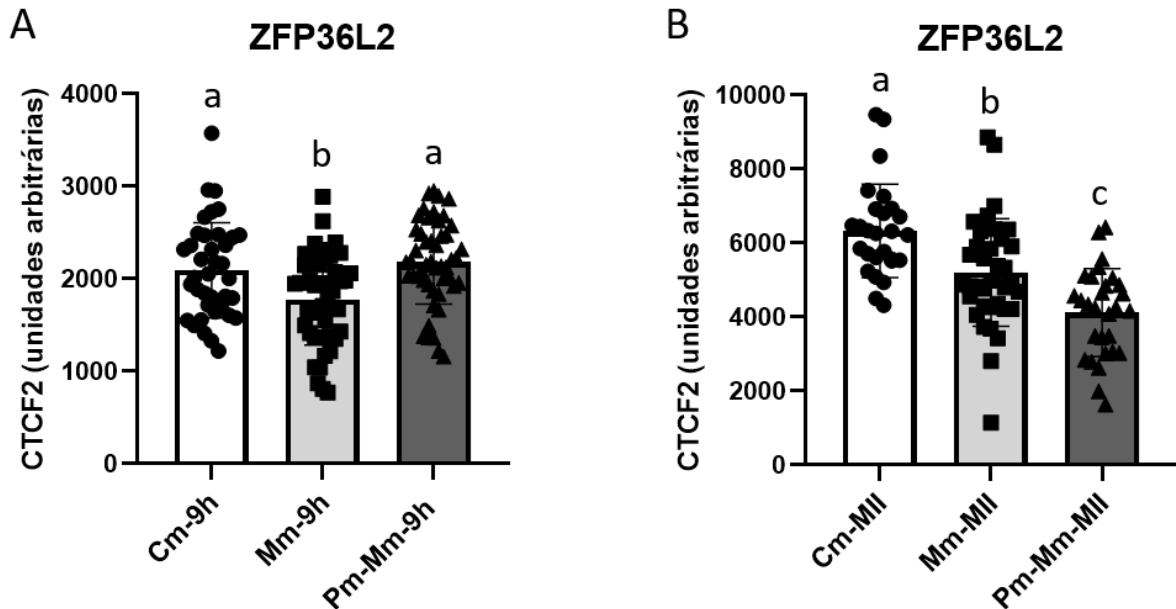


Figura 23 - Níveis proteicos de ZFP36L2 em oócitos dos grupos MIV controle (Cm), MIV modificada (Mm) e MIV modificada precedida pela pré-MIV (Pm-Mm) às 9h (A) e às 19h (estágio MII) de MIV (B) por imunocitoquímica (IF). Valores calculados em unidades arbitrárias, a partir da intensidade de fluorescência após aplicação de 2 fatores de correção: background (CTCF1) e média de intensidade do controle negativo (CTCF2). Letras diferentes acima das barras representam diferença ($p < 0,05$).

Entretanto, os resultados encontrados na avaliação por IF não foram validados pelos resultados obtidos por *western blotting*. Foram analisados, por grupo experimental, 10 pools de 50 oócitos às 9h e seis pools de 50 oócitos MII às 19h de MIV. Não foram observadas diferenças para os valores de ZFP36L2 entre oócitos dos grupos Cm, Mm e Pm-Mm em nenhum dos dois horários avaliados (Figura 24).

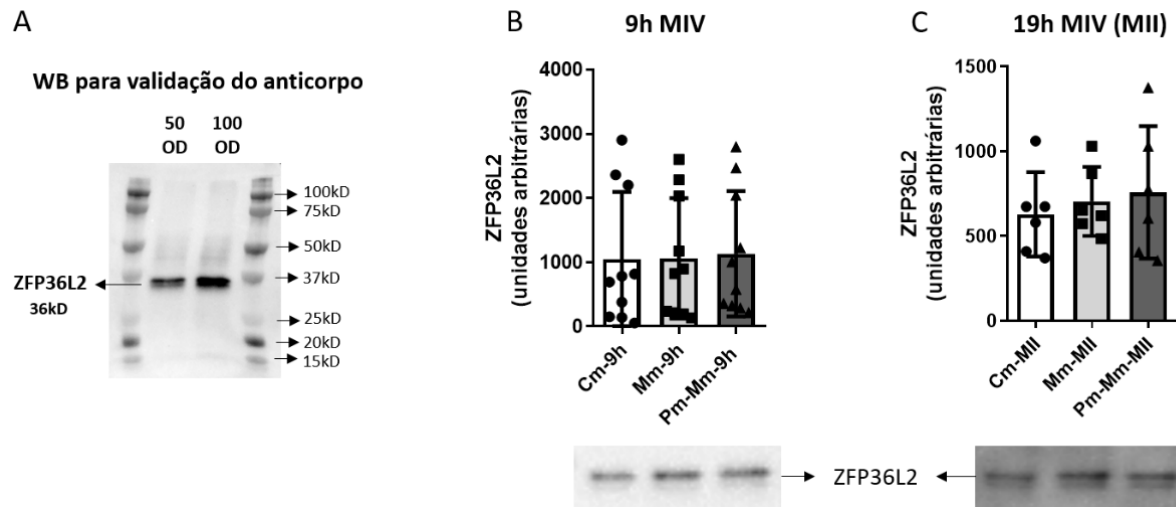


Figura 24 – (A) Validação do anticorpo anti-ZFP36L2 por *western blotting*; (B) níveis proteicos de ZFP36L2 em oócitos dos grupos Cm, Mm e Pm-Mm às 9h de MIV e (C) às 19h em oócitos MII.

7.2.1. A pré-MIV com CNP e a MIV modificada aumentam a expressão de diversos genes participantes das vias de tradução e degradação de RNAm nas células do *cumulus*

O tratamento com CNP durante 9h induziu aumentos de expressão de quatro genes relacionados ao processo de tradução de RNAm nas células do *cumulus* (Figura 25). *EIF4B* ($p < 0,0001$, 1,8 *fold*), *EIF4G2* ($p = 0,0002$, 1,4 *fold*), *PABPC1* ($p = 0,0001$, 1,9 *fold*) e *PAIP1* ($p = 0,0003$, 1,6 *fold*) tiveram sua expressão aumentada no *cumulus* de oócitos pré-maturados com CNP, quando comparadas com o controle imaturo. Dentre os genes envolvidos com processos de desadenilação e degradação de transcritos, apenas *CNOT7* ($p = 0,0464$, 1,15 *fold*) teve seus níveis aumentados ao final da pré-MIV. *MAPKAPK2*, gene ligado a vias de sinalização e que aqui está sendo estudado por seu envolvimento com a inativação de ZFP36L2, também mostrou aumento de expressão ($p < 0,0001$, 2,9 *fold*) ao final da pré-MIV, comparado com oócitos recém retirados dos folículos (Figura 25).

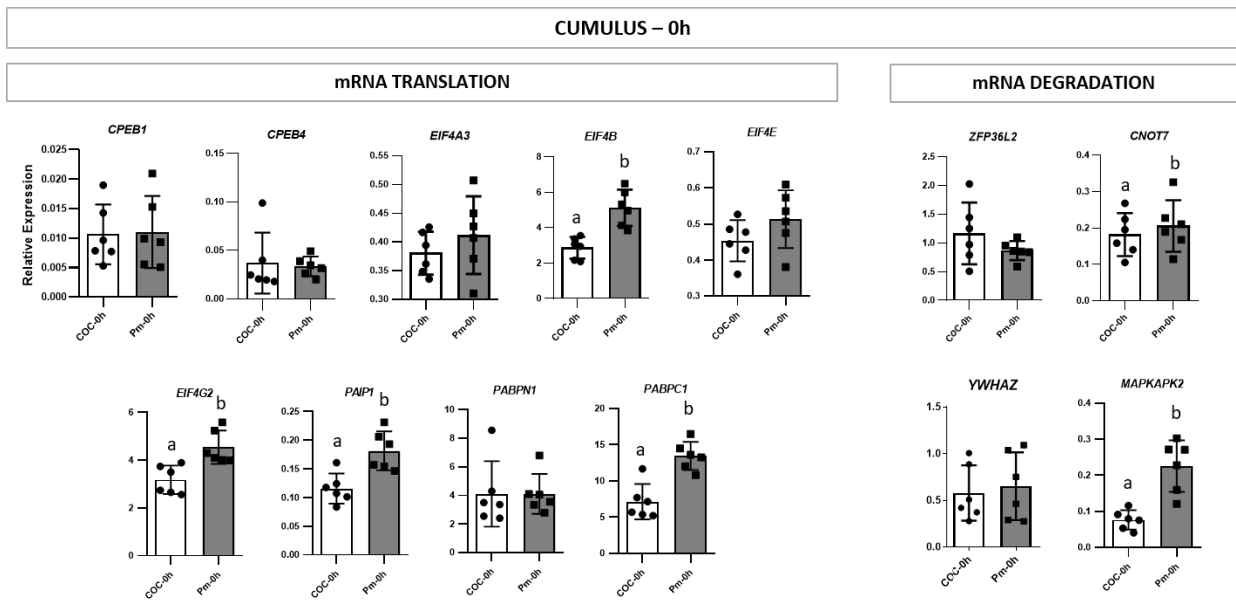


Figura 25 - Expressão relativa de genes participantes das vias de tradução e degradação de RNAm em células do *cumulus* dos grupos imaturo (COC-0h) e ao final da pré-MIV (Pm-0h). Letras diferentes acima das barras representam diferença ($p < 0,05$).

Às 9h de MIV, o meio de maturação modificada induziu aumentos da expressão de cinco genes relacionados à tradução, e três genes relacionados à degradação de transcritos nas células do *cumulus* (Figura 26). *CPEB4*, gene que codifica uma proteína reguladora da extensão da cauda poli-A do RNAm, teve sua expressão aumentada em ambos os grupos maturados em meio modificado ($p < 0,0001$, 1,8 e 1,6 *fold* para Mm e Pm-Mm, respectivamente). O mesmo padrão de expressão foi observado para *EIF4G2* ($p = 0,0009$, 1,4 e 1,2 *fold* para Mm e Pm-Mm), gene que produz uma proteína homóloga à EIF4G1. O gene *EIF4E* teve sua expressão aumentada ($p = 0,0014$, 1,4 *fold*) pelo meio de MIV modificada, mas a adoção da etapa de pré-MIV inibiu esse efeito (Figura 26).

Dos genes relacionados ao mecanismo de degradação de RNAm, *ZFP36L2* ($p = 0,002$, 1,3 *fold*) e *MAPKAPK2* ($p < 0,0001$, 1,8 *fold*) tiveram suas expressões aumentadas apenas em *cumulus* de oócitos diretamente maturados em meio modificado, comparados aos grupos controle e que passou pela pré-MIV. *CNOT7* mostrou-se diferencialmente ($p = 0,002$, 1,4 *fold*) expresso apenas entre MIV modificada (Mm) e controle (Cm), estando em maiores níveis nas células do *cumulus* maturadas com meio modificado (Figura 26).

O mesmo padrão de expressão de *CNOT7* foi observado em *PABPN1* ($p = 0,0208$, 1,2 *fold*), enquanto *PABPC1* teve sua expressão aumentada ($p < 0,0001$, 1,6 *fold*) nas células do

cumulus do grupo da MIV modificada em relação ao controle e MIV modificada com pré-MIV. (Figura 26).

As diferenças de expressão gênica nas células do *cumulus* foram menos acentuadas às 19h de MIV (Figura 26). Nesse momento de avaliação, apenas três genes relacionados à atividade traducional apresentaram diferenças de expressão entre os grupos. *CPEB1* foi diferencialmente expresso ($p=0,005$) entre todos os grupos, sendo mais expresso no grupo controle, expressão intermediária na MIV modificada (0,8 *fold*) e menos expresso no grupo que passou pela pré-MIV (0,6 *fold*) (Figura 27). *CPEB4* apresentou maiores ($p=0,0019$) níveis de expressão em *cumulus* dos dois grupos maturados em meio modificado (1,3 *fold* para Mm e 1,2 para Pm-Mm) comparados com o grupo controle. Os grupos maturados em meio modificado mostraram menores níveis ($p=0,0045$, 0,8 *fold*) de expressão de *EIF4E* quando comparados ao controle (Figura 26).

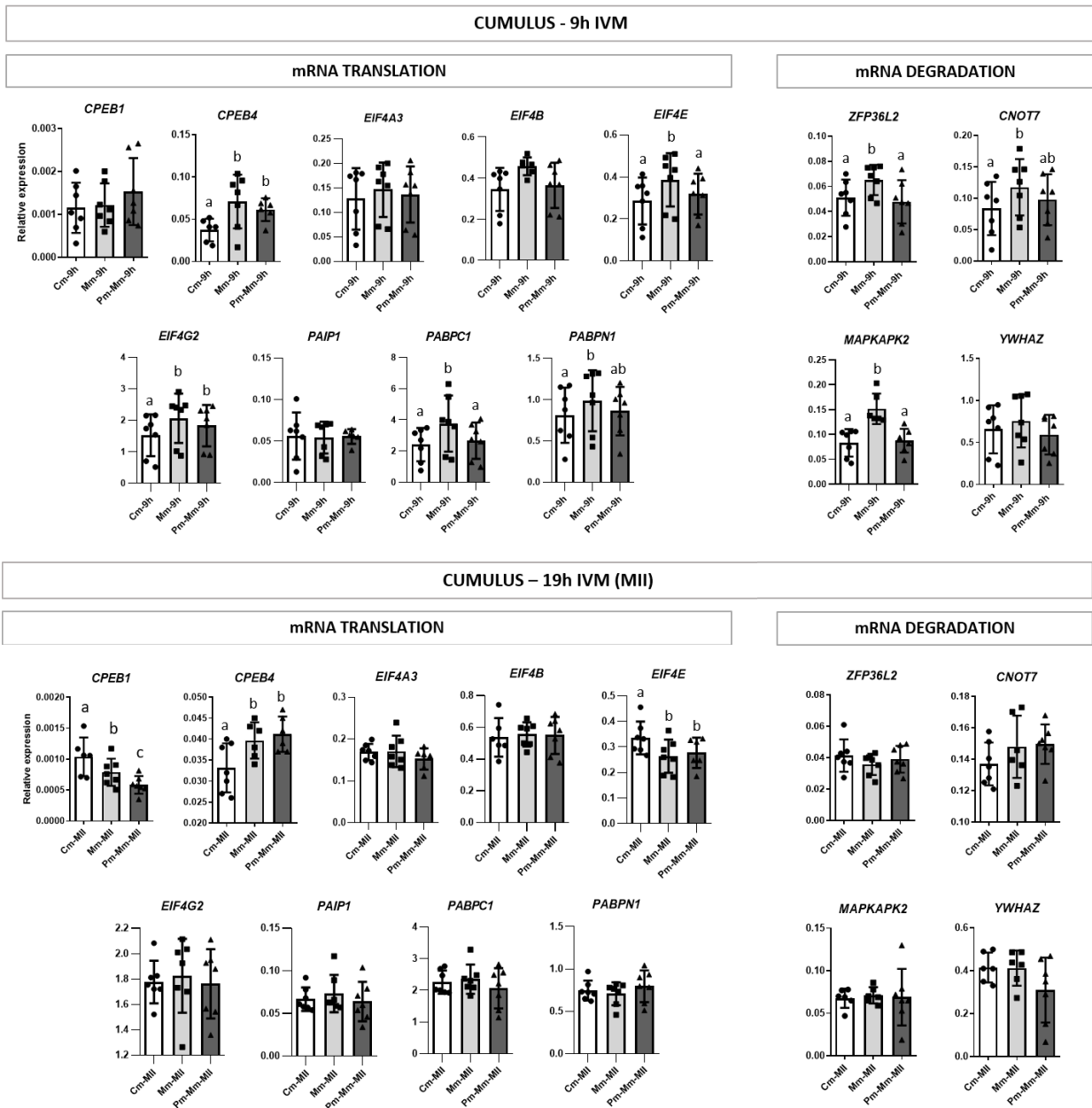


Figura 26 - Expressão relativa de genes participantes das vias de tradução e degradação de RNAm em células do *cumulus* às 9h e 19h de MIV, dos grupos Cm, Mm e Pm-Mm. Letras diferentes acima das barras representam diferença ($p < 0,05$).

8. DISCUSSÃO

8.1. Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”.

A etapa de maturação *in vitro* é conhecida como um dos “gargalos” do sistema de PIVE, e por isso tem sido objetivo de estudo de muitos grupos de pesquisa em todo o mundo. É importante salientar que, mesmo com todos os avanços alcançados nas tecnologias de PIVE nos últimos anos e principalmente com aqueles relacionados à etapa de MIV, a qualidade intrínseca do COC ao ser colocado nesse sistema ainda interfere de forma significativa na qualidade dos resultados no sistema *in vitro*.

Os achados deste estudo demonstram que o estágio inicial de desenvolvimento do oócito pode afetar sua resposta a protocolos de modulação meiótica. A possibilidade de utilizarmos um sistema de imagem de alta qualidade nos permitiu identificar diferenças interessantes, quanto a graus de condensação de cromatina e características físicas de envelope nuclear, dentro de uma mesma categoria de GV. Pudemos observar que tais diferenças influenciaram as respostas dos COCs ao tratamento com CNP durante a pré-MIV, o que nos sugere que a possibilidade de diagnosticar essas diferenças antes da adoção de um protocolo modulador seria de grande valia. Neste trabalho, propomos um refinamento do sistema tradicional de classificação dos estágios de GV, que pode servir como uma útil ferramenta em novos estudos dentro desse escopo.

O protocolo de pré-MIV utilizado nesse estudo foi eficiente em manter o bloqueio meiótico em aproximadamente 80% dos oócitos. Utilizando esse mesmo protocolo, Soares e colaboradores (2017) observaram taxas de 80% em oócitos *Bos taurus* e de 95% em *Bos indicus*. No entanto, quando utilizamos a marcação do DNA associada ao protocolo de imunocitoquímica para visualizar o envelope nuclear, pudemos observar que, além daqueles cerca de 20% de oócitos que romperam a vesícula germinativa e retomaram a divisão meiótica, os que permaneceram bloqueados pelo CNP passaram por uma redistribuição interessante quanto à frequência dos estágios de GV. A progressão da condensação da cromatina que foi observada em oócitos a partir do estágio de GV2.2 pode ser explicada pela duração do protocolo de pré-maturação (9h) e também pela concentração de CNP utilizada nesse estudo (100 nM). Diversos estudos demonstraram que a eficiência do CNP para manter o bloqueio meiótico é dependente da dose utilizada e também do tempo de duração do tratamento. Em bovinos, 200 nM de CNP foram eficientes em bloquear a retomada da meiose oocitária por 6 a 8h (Xi *et al.*, 2018; Jia e

Wang, 2020), enquanto que 100 nM promoveu esse efeito apenas até 6h de tratamento (Franciosi *et al.*, 2014; Soto-Heras *et al.*, 2019). Em pequenos ruminantes, 200 e 1000 nM de CNP mantiveram os oócitos meioticamente bloqueados por 4 e 8h, respectivamente (Zhang *et al.*, 2017; Assareh *et al.*, 2022). Dessa forma, é possível considerar que a concentração de 100 nM de CNP utilizada no presente estudo não tenha sido suficiente para manter os níveis de GMPc altos após 6h *in vitro*, e aqueles oócitos em estágios mais avançados de GV provavelmente foram mais susceptíveis a essa queda no GMPc e progrediram na condensação da cromatina e no rompimento do envelope nuclear. Isso resultou em diminuição da proporção de oócitos GV2 e aumento da população de GV3 ao final da pré-maturação.

Quando observamos os dados da distribuição dos estágios de GV antes e depois da pré-MIV com CNP, não pudemos deixar de notar que, proporcionalmente, a população de GV1 também aumenta ao final do protocolo, com um maior aumento na categoria GV1.3 e diminuição considerável em GV2.1. Esse padrão de redistribuição também foi observado nas análises de atividade transcricional (ensaio com Click-iT) e de densidade de TZPs entre GVs diferentes (dados não contabilizados). Esses achados sugerem que talvez exista um “ponto de divergência” dentro da categoria GV2, que separa duas categorias distintas: os oócitos que possuem maior capacidade de progressão na condensação da cromatina e por isso necessitam de maiores níveis de GMPc para permanecerem no bloqueio meiótico, e aqueles que se mantêm bloqueados com doses menores de CNP e, hipoteticamente, podem até “regredir” à categoria GV1.3. De acordo com nossa proposta de classificação refinada, o que diferencia oócitos em GV2.1 de GV2.2 é o grau de condensação da cromatina. A cromatina em GV2.2 é a cromatina clássica da categoria, condensada e distribuída em *clumps* dentro do núcleo. A cromatina GV2.1, segundo nossa proposta, possui distribuição mais ampla com *clumps* em formação inicial, encontra-se condensada mas pode conter alguns pontos de descondensação. Um estudo interessante com suínos mostrou que a pré-MIV com roscovitina e fluido folicular foi capaz de promover descondensação da cromatina e aumentar a transcrição nesses oócitos, melhorando diversas características associadas com competência ao desenvolvimento (Zhang *et al.*, 2017). Ao nosso entendimento, esse é o único estudo em oócitos mamíferos que relata um processo semelhante ao que observamos no presente trabalho. Hayakawa e Tanaka (2021) descreveram que a histona H1 específica de oócito (H1foo) se encontra associada com o receptor beta associado ao receptor nuclear de estrógeno Esrrb e pode promover descondensação da cromatina em locais em que se encontram genes de efeito materno. O protocolo de pré-MIV utilizado neste trabalho suplementa estradiol com o intuito de aumentar a expressão de *NPR2* e a sensibilidade destes

receptores ao CNP (Egbert *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2016, Soares *et al.*, 2017, Xi *et al.*, 2018). É tentador sugerir que a associação desses fatores possa explicar o fenótipo observado no nosso estudo, porém mais estudos são necessários para verificar pontualmente se esse fenômeno realmente acontece em oócitos durante a transição entre GV1 a GV2.

Fisiologicamente, os processos de remodelamento da cromatina e de silenciamento transcricional, que estão associados com a aquisição da competência, são controlados pelos níveis de AMPc no oócito e, conseqüentemente, pela comunicação ativa entre o gameta e o *cumulus* através das junções *gap* (De La Fuente e Eppig, 2001; Luciano *et al.*, 2011). Estudos prévios demonstraram que o estágio de desenvolvimento do COC pode afetar sua resposta aos protocolos de pré-MIV. COCs provenientes de folículos menores, ou seja, aqueles em estágios iniciais de GV, parecem ser mais beneficiados e responder melhor a estratégias de bloqueio meiótico em comparação com oócitos em estágio mais avançados de GV (Fair *et al.*, 2002; Lodde *et al.*, 2007). Uma das explicações é que oócitos em estágios mais avançados já possuem menor comunicação, via junções *gap*, com as células do *cumulus* (Lodde *et al.*, 2007; Luciano *et al.*, 2011). Essa menor comunicação pode estar associada ao aumento do FSH durante essa fase, que induz o início dessas rupturas por sinalização que é mediada por altos níveis de AMPc (Prochazka *et al.*, 2012). Portanto, estratégias de pré-MIV que propõem atuar mediante a comunicação dentro do COC provavelmente não vão beneficiar tanto os oócitos em estágios mais avançados de GV. Além disso, o tempo adicional no ambiente *in vitro* que é promovido pela pré-MIV pode resultar em processos de envelhecimento e atresia tanto nos oócitos em estágios de GV mais avançados quanto em suas células do *cumulus* (Dieci *et al.*, 2016).

Corroborando essa afirmação, nossos resultados mostraram que a densidade de TZPs diminuiu em COCs pré-maturados comparados com imaturos, bem como em COCs GV3 pré-maturados comparados com os GV1 também pré-maturados. Os achados da análise de expressão gênica contribuem para o entendimento desse fenótipo: *ERK2* e *PRKACA* (gene que codifica uma das subunidades catalíticas da PKA) tiveram seus níveis de expressão aumentados em células do *cumulus* pré-maturadas, comparadas com o controle imaturo. Ambos genes são conhecidos por seu envolvimento na modulação da divisão meiótica e na cascata de sinalização que se inicia com o pico de LH. A transativação do EGFR nas células do *cumulus*, mediada por AREG, EREG e BTC, resulta na ativação da cascata ERK1/2 e na amplificação dos sinais do LH nas células do *cumulus* e no oócito (Park *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2006). Além disso, a ligação do FSH aos seus receptores no *cumulus* resulta em aumento dos níveis de AMPc via AC, que por sua vez estimulam a atividade de PKA nesse compartimento. Uma das conseqüências dessa

ativação é o aumento da expressão de fatores *EGF-like* e, conseqüentemente, amplificação da via ERK1/2 (Conti *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2015). Embora a concentração de FSH utilizada na pré-MIV deste estudo seja baixa, o período de 9h sob efeito do FSH pode ter gerado aumento nos níveis de AMPc e, conseqüentemente, nas expressões de *ERK2* e *PRKACA*. Os reflexos desse aumento puderam ser observados nas densidades de TZPs. A via de sinalização ERK1/2 participa do processo de retração das TZPs de duas maneiras: aumentando a ativação de calpaínas (proteases que clivam N-caderinas nas junções aderentes), e ativando o complexo Arp2/3, que altera o padrão da F-actina de linear para ramificado, causando a desmontagem das extremidades das TZPs (Abbassi *et al.*, 2021). A sinalização ERK1/2 também promove a fosforilação de proteínas conexas nas junções *gap*, resultando em seu fechamento (Park *et al.*, 2004). O aumento da expressão de *PRKACA* também pode ter contribuído para a diminuição da densidade de TZPs nos COCs GV3 pré-maturados. Níveis altos de GMPc nas células do *cumulus* podem temporariamente impedir a retração das TZPs, mesmo se houver suplementação de EGF ao meio de cultivo (Abbassi *et al.*, 2021). Porém, PKA pode estimular a degradação do GMPc através da fosforilação e ativação de PDE5, enzima que hidrolisa este nucleotídeo cíclico (Egbert *et al.*, 2016). Além disso, a transativação do EGFR também resulta na diminuição da sensibilidade do NPR2 ao CNP/CNP em um mecanismo que é cálcio-dependente (Hao *et al.*, 2016). Diante disso, a associação entre o aumento nas expressões de *ERK2* a *PRKACA*, uma provável queda no GMPc que é decorrente da ativação dessas vias e da diminuição do efeito do CNP a partir de 6h *in vitro* pode ter acarretado no aumento da retração das TZPs nos COCs em estágios mais avançados de GV. Visto que os níveis de expressão de *GDF9* e *BMP15* não foram diferentes entre oócitos imaturos e pré-maturados, podemos inferir que os mecanismos que envolveram essa retração de TZPs durante a pré-MIV foram mediados pelo compartimento somático. O fator GDF9 pode orientar a formação de TZPs através do estímulo da expressão de proteínas-chave que compõem sua estrutura filopodial (El-Hayek *et al.*, 2018), mas neste estudo, esse mecanismo não deve ter sido suficiente para contrapor o processo provavelmente mediado pela via ERK1/2.

Essa abordagem pode ser utilizada também para explicar a menor densidade de TZPs às 9h de MIV nos grupos maturados em meio modificado. A suplementação desse peptídeo durante a MIV tem promovido bons resultados quanto à qualidade de oócitos e embriões em diversas espécies (Zhang *et al.*, 2017; Rouhollahi Varnosfaderani *et al.*, 2020; Akin *et al.*, 2022; Assareh *et al.*, 2022). O AREG modula, por meio do EGFR, vias importantes que estão associadas ao desenvolvimento e metabolismo de células do *cumulus* e oócitos, e sua suplementação durante a MIV tem melhorado a competência oocitária ao desenvolvimento (Shimada *et al.*, 2006,

Prochazka *et al.*, 2012; Richani *et al.*, 2014). No entanto, assim como foi visto em nosso trabalho, esse peptídeo já foi associado ao fechamento das comunicações, via junções *gap*, entre *cumulus* e oócito (Norris *et al.*, 2010). A suplementação de BMP15 ao meio de MIV auxilia na manutenção dessas junções abertas, mesmo na presença de AREG (Sugimura *et al.*, 2014). Em nosso estudo, *ERK2* e *PRKACA* também foram mais expressos às 9h de MIV em células do *cumulus* de ambos os grupos maturados com AREG, enquanto nos oócitos não houve diferenças de expressão, para *GDF9* e *BMP15*, entre as maturações controle e modificada, o que demonstra que diante do estímulo promovido pelo AREG, os níveis endógenos de *BMP15* e *GDF9* não são suficientes para inibir a retração de TZPs nos COCs. Podemos sugerir que a explicação acima exposta é válida pelo fato de que os COCs diretamente maturados em meio modificado também possuem menor densidade de TZPs que o grupo controle e que não diferiram, quanto a esse parâmetro, dos COCs que passaram pela pré-maturação. Ou seja, esse mecanismo não foi gerado unicamente pelo maior tempo *in vitro* promovido pela adição da etapa de pré-MIV.

Embora o meio de MIV modificada tenha induzido um aumento na retração das TZPs às 9h de MIV, as taxas de maturação às 19h não foram prejudicadas nos COCs diretamente maturados em meio modificado. Porém, os COCs que passaram pela pré-maturação geraram menores taxas de extrusão do primeiro corpúsculo às 19h de MIV quando comparados com os grupos diretamente submetidos à MIV. Entretanto, quando desnudávamos os oócitos para coletá-los para análise de expressão gênica às 9h de MIV passamos a observar com frequência a presença de corpúsculos extrusos no grupo passou pela pré-MIV. Quando finalizamos a avaliação de bloqueio meiótico ao final da pré-MIV e observamos que cerca de 20% dos oócitos retomava a divisão meiótica durante a pré-maturação, começamos a avaliar taxa de MII também às 9h de MIV, para verificar se esses oócitos adiantados não estariam atingindo o estágio de MII precocemente e subestimando a taxa desse grupo às 19h de MIV. Avaliamos entre 30 e 50 oócitos por grupo experimental e por replicata, em seis replicatas diferentes, e observamos que cerca de 25% dos oócitos que passaram pela pré-MIV atingiram o estágio de MII às 9h de MIV, enquanto nos outros dois grupos não foram observados corpúsculos extrusos em nenhuma das rotinas. Alguns estudos têm mostrado que a cinética da divisão meiótica pode estar associada à competência, uma vez que oócitos provenientes de doadoras pré-púberes progridem mais lentamente durante a meiose quando comparados com oócitos de fêmeas adultas (Khatir *et al.*, 1998; Leoni *et al.*, 2015). Um estudo de Mayes e Sirard (2000) mostrou que oócitos de qualidade grau III (e que são equivalentes aos GV3, de acordo com dados de Dieci *et al.*, 2016) progridem mais rapidamente na divisão meiótica do que os oócitos de graus I e II (equivalentes a GV1 e

GV2). Oócitos bovinos e suínos pré-maturados com roscovitina ou butirolactona apresentaram cinética mais rápida de formação e extrusão do primeiro corpúsculo polar (Lagutina *et al.*, 2002; Adona *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2017). Esses dados nos levam a ponderar que protocolos de modulação meiótica podem alterar a cinética de maturação nos oócitos de acordo com seu estágio inicial de desenvolvimento.

Na contramão de todos os outros parâmetros avaliados neste estudo, observamos menores taxas de expansão nas células do *cumulus* durante a MIV nos grupos da MIV modificada. A expansão do *cumulus*, tradicionalmente vista como marcador de qualidade, é um processo guiado tanto pelo oócito quanto por suas próprias células adjacentes. BMP15 e GDF9 modulam o metabolismo das células do *cumulus* através do aumento da expressão de diversas enzimas da via de biossíntese do colesterol (Su *et al.*, 2008), além de regularem a proliferação e a diferenciação destas células após o pico de LH (Dong *et al.*, 1996). Entretanto, como observamos nos resultados de expressão gênica, as diferenças nos níveis de *HAS2*, *PTX3* e *TNFAIP6* entre grupos tratados e controles não podem ser explicadas por esse argumento, já que as expressões de *GDF9* e *BMP15* foram semelhantes entre os grupos. Nossos resultados vão na contramão de outro estudo que observou maiores expressões de *HAS2*, *TNFAIP6* e *PTGS2* em COCs bovinos suplementados com AREG (Sugimura *et al.*, 2018). Uma possível explicação para esse fenótipo é a presença de soro fetal bovino (SFB) no meio convencional *versus* a albumina sérica bovina (BSA) no meio de MIV modificada. A matriz extracelular que é secretada durante a expansão do *cumulus* é composta por ácido hialurônico, algumas proteínas estruturais como petraxina 3 (PTX3) e TGS-6, e por cadeias pesadas que são transportadas por proteínas da família inter- α -I (I- α -I) (Rugg *et al.*, 2005). TGS-6 processa a transferência das cadeias pesadas das proteínas I- α -I para o ácido hialurônico (Rugg *et al.*, 2005; Lord *et al.*, 2020), entretanto, proteínas I- α -I não são sintetizadas pelo *cumulus*, mas sim pelo fígado, e chegam até o folículo através do soro (Chen *et al.*, 1996; Irving-Rodgers *et al.*, 2002). O fato de não haver a inclusão de SFB nos grupos da MIV modificada, ou de haver SFB na MIV controle, pode ter causado essa diferença não só nos dados de morfometria da expansão do *cumulus*, mas também na expressão de genes relacionados. É interessante mencionar que, ao contrário de *HAS2* (gene que codifica a enzima que sintetiza o ácido hialurônico) e *TNFAIP6* (gene que codifica TGS-6), *PTX3* foi menos expressa no grupo que apresentou maior expansão do *cumulus*. Petraxina 3 participa na organização estrutural da matriz extracelular, mas sua ausência não impede a incorporação de cadeias pesadas à estrutura de ácido hialurônico (Salustri, 2003). Esses fatos

sugerem que a presença de soro no meio convencional por ter sido a causa da maior expansão do *cumulus* nesses grupos.

Apesar do aumento proporcional na categoria GV1 ao final da pré-MIV, o ensaio de atividade transcricional mostrou que apenas uma pequena parte desses GV1 estava transcrevendo durante as últimas 4h da pré-MIV. O processo de silenciamento transcricional ocorre durante a transição entre os estágios de GV e é mediado por modificações epigenéticas em DNA e histonas, paralelamente ao remodelamento gradual da cromatina (De La Fuente *et al.*, 2004; Lodde *et al.*, 2008; Labrecque *et al.*, 2015). Mesmo que oócitos provenientes de folículos de 2 mm de diâmetro já sejam capazes de retomar a divisão meiótica, esses GV iniciais possuem menores competências molecular e citoplasmática para gerarem um embrião saudável, capaz de implantar e vir a termo (Fair *et al.*, 1995). Assim, estratégias que objetivam prolongar o tempo de transcrição e de comunicação entre o oócito e *cumulus* se propõem a serem benéficas para essa categoria de oócitos. Em suínos, o aumento da atividade transcricional foi benéfico para oócitos pré-maturados com roscovitina e fluido folicular, pois aumentou os níveis de expressão de genes associados à competência ao desenvolvimento, além de melhorarem parâmetros como distribuição de grânulos corticais, expansão das células do *cumulus* e taxa de blastocistos (Zhang *et al.*, 2017). Apesar de não termos observado esse padrão no nosso estudo, é digno de nota que a categoria de GV1 que apresentou maior número de oócitos transcionalmente ativos foi GV1.3, ou seja, a cromatina GV1 com menor grau de pontos de condensação. Como dito anteriormente, se essa categoria estaria sendo incrementada pela categoria GV2.1 durante o tratamento com CNP e ainda assim mantendo atividade transcricional, mais estudos seriam necessários para confirmar se essa hipótese é verdadeira e quais mecanismos tornariam isso possível.

Com esse estudo, concluímos que o estágio de desenvolvimento do oócito afeta de forma importante a sua resposta a protocolos de modulação meiótica. A heterogeneidade nos estágios de desenvolvimento dos COCs utilizados na PIVE é ampla. A utilização de moduladores meióticos, ainda que sejam biológicos (em detrimento dos farmacológicos), podem resultar em ativação de vias que podem ser benéficas para uma determinada categoria de COCs e malélicas para outras. O desafio dos sistemas *in vitro*, sob esse ponto de vista, não é apenas criar tecnologias melhores, mas sim tecnologias direcionadas e que produzam o melhor resultado em cada uma das categorias de COCs.

8.2. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.

Nesse estudo, pudemos observar que moduladores meióticos, como o CNP e o AREG, não afetam apenas a divisão meiótica e a comunicação no COC, mas também mobilizam a expressão de genes ligados aos processos de tradução e degradação de RNAm nas células do *cumulus*. Ainda que os efeitos observados nos oócitos tenham sido sutis, o *cumulus* participa de forma ativa da modulação da retomada da meiose e antes disso, do suporte nutricional durante a fase final do crescimento do gameta. Aumentos na síntese proteica e na modulação de transcritos podem ser encarados como uma forma de melhorar a qualidade do COC durante esse período, tendo em vista que as células do *cumulus* podem suprir o oócito não só com micromoléculas, mas também com macromoléculas como RNAs e proteínas, podendo colaborar no aporte das mesmas ao gameta durante o período de quiescência transcricional (Clarke, 2012; Macaulay *et al.*, 2014; Del Collado *et al.*, 2017).

Alguns dos genes que tiveram expressões aumentadas pelos tratamentos com CNP e AREG codificam membros do complexo *eukaryotic initiation factor* (eIF), *EIF4B*, *EIF4E* e *EIF4G2*, e proteínas associadas ao funcionamento desse complexo, *PABPC1*, *PABPN1* e *PAIP1*, que se ligam à cauda poli(A) do RNAm. A modulação de GMPc e AMPc, promovida pelo CNP, pode ser a explicação para essa mobilização na expressão gênica nessas células. GMPc e AMPc podem estimular a transcrição em diversos tipos celulares, incluindo no *cumulus* (Pilz e Casteel, 2003; Campen *et al.*, 2015). Como já foi descrito, níveis altos de GMPc mantém os níveis de AMPc altos, levando à ativação da PKA. Uma das ações da PKA é ativar fatores de transcrição, e consequentemente, estimular a expressão de vários genes, dentre eles *AREG*, *EREG* e *BTC* (Su *et al.*, 2002; Conti *et al.*, 2006). Entre os substratos de ERK1/2, a proteína *ribosomal S6 kinase 1* (RSK1) pode induzir o início do processo de tradução através da fosforilação de eIF4B (Sonenberg e Hinnenbusch, 2009; Andreou *et al.*, 2017). EIF4B é um cofator que interage com eIF4A e eIF4G para formar pontes auxiliares entre o RNAm e a subunidade ribossomal 40S (Methot *et al.*, 1996). O gene EIF4G2 codifica uma proteína homóloga a eIF4G1 e que participa de vias de tradução não canônicas, devido à ausência de sítios de ligação com eIF4E e PABPs (Liu *et al.*, 2023). *PABPC1* e *PABPN1* codificam proteínas que se ligam à cauda poli(A) e são encontradas tanto em oócitos quanto embriões. Estimulação hormonal em camundongos resulta na diminuição na expressão de PABPC1 em oócitos em estágio de GV (Siemer *et al.*, 2009;

Ozturk *et al.*, 2014). A proteína *poly(A) binding protein interacting 1* (PAIP1) regula a interação de PABPs com eIF4A (Craig *et al.*, 1998). O aumento da expressão desses genes ao final da pré-maturação e às 9h de MIV sugere que a regulação da tradução, via extremidade cap 5', parece ser estimulada por vias ligadas a nucleotídeos cíclicos e ERK1/2.

Além dos genes associados à regulação da tradução, alguns genes pertencentes à maquinaria de degradação e sua regulação também tiveram suas expressões estimuladas pelos protocolos de pré-MIV e MIV modificada. *CNOT7* codificada uma das subunidades catalíticas do complexo CCR4-NOT, o principal complexo desadenilase encontrado em eucariontes e que atua promovendo a diminuição da cauda poli(A) e, conseqüentemente, a inibição da tradução (Collart, 2016, Yi *et al.*, 2018). *MAPKAPK2* também teve sua expressão aumentada pela pré-MIV e pela MIV modificada. Esse gene codifica *MAPK activated protein kinase 2* (MK2), uma das quinases que participam da cascata de sinalização da via p38 MAPK (Huot *et al.*, 1995). Um dos fatores que ativam essa via é o aumento da atividade da PKA, que pode ser estimulado pelo AMPc e FSH (Yu *et al.*, 2005; Yen *et al.*, 2014). Ativada, MK2 pode fosforilar e inativar membros da família ZFP36. Esse mecanismo já foi descrito em diversas linhagens celulares, e leva à inibição da atividade das ZFP36 e, conseqüentemente, à estabilização de seus transcritos-alvo (Chrestensen *et al.*, 2004; Stoecklin *et al.*, 2004; Clement *et al.*, 2011). A inibição da atividade das ZFP36 é mediada pela alteração estrutural no seu sítio de ligação com CNOT7, decorrente da fosforilação. Essa alteração acaba reduzindo a afinidade à CNOT7 e favorece a ligação entre as ZFP36 e proteínas 14-3-3, resultando na formação um complexo inativo (Johnson *et al.*, 2002; Chrestensen *et al.*, 2004; Marchese *et al.*, 2010; Clement *et al.*, 2011; Adachi *et al.*, 2014).

Estes achados nos fazem ponderar se a via de degradação de RNAm estaria mais estimulada ou mais inibida nas células do *cumulus*. Além de *CNOT7* e *MAPKAPK2*, a expressão de *ZFP36L2* também se mostrou aumentada às 9h da MIV modificada, assim como *MAPKAPK2*. A proteína ZFP36L2 é conhecida por mediar a regulação de respostas imunes em vários tipos de células e tecidos, além de modular a degradação de RNAm ligados ao ciclo celular (Vogel *et al.*, 2017; Suk *et al.*, 2018; Toeuf *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2021). Em camundongos, a indução do pico de LH aumenta a expressão de *Zfp36* em células da granulosa, mecanismo que é mediado pela ativação de EGFR-ERK1/2 (Xi *et al.*, 2021). Outros estudos ajudam a explicar a maior expressão desse gene no grupo suplementado com AREG. As proteínas da família ZFP36 reconhecem e se ligam a sequências específicas ricas em adenina e uridina (*AU-rich sequences*, ou domínios ARE) na 3' UTR do RNAm (Fenger-Gron *et al.*, 2005; Sha *et al.*, 2018), porém possuem essas sequências em seus próprios transcritos, que podem ser degradados por mecanismo de *feedback*

negativo (Brooks *et al.*, 2004). Dessa forma, é possível que a maior expressão de *ZFP36L2* nas células do *cumulus* maturadas em meio modificado, como observamos às 9h de MIV, não seja devido à maior expressão, mas sim uma diminuição da degradação desses transcritos causada por uma possível fosforilação de *ZFP36L2* mediada por MK2. Se essa hipótese é verdadeira, é razoável ponderar que a etapa de pré-MIV ameniza essa resposta, e análises futuras poderiam ajudar a esclarecer como e porquê isso acontece.

Diferenças na expressão gênica foram menos pronunciadas em células do *cumulus* de oócitos em estágio MII. Apenas três genes se mostraram diferencialmente expressos, e em padrões distintos de expressão. *CPEB1* e *CPEB4* mostraram padrões de expressão opostos, e o que nos permite especular se no *cumulus* essas proteínas alternam sua atividade da mesma forma que acontece no oócito (Igea e Méndez, 2010), já que ambas também regulam o processo de poliadenilação durante o ciclo celular mitótico (Novoa *et al.*, 2010). A diminuição nas expressões de *CPEB1* e *EIF4E* causada pela MIV modificada não necessariamente sugere que os mecanismos de tradução estejam sendo prejudicados, já que não houveram diferenças nas expressões dos demais genes estudados.

Independente dos horários de avaliação, os oócitos foram bem menos susceptíveis aos efeitos da MIV modificada na modulação da expressão dos genes avaliados neste estudo. No experimento inicial, que foi o passo inicial deste trabalho, observamos que a maturação *in vitro* convencional alterava a expressão de apenas um (*ZFP36L2*) dentre os quatro genes que havíamos escolhido para analisar. Baseado nesse resultado, nos propomos a testar os mesmos genes, com um foco especial em *ZFP36L2*, nos três sistemas de MIV propostos neste trabalho. O único gene cuja expressão foi alterada pela MIV modificada foi *ZFP36L2* e, curiosamente, em um padrão oposto ao observado no *cumulus*. *ZFP36L2* desempenha um papel importante durante a meiose oocitária, e possui entre seus alvos diversas ciclinas, *early mitotic inhibitors 1* e *2* (Emi1, também conhecido como FBXO5, e Emi2, ou FBXO43), e várias desmetilases de histonas cujas degradações são necessárias durante o processo de silenciamento transcricional (Belloc e Méndez, 2008; Chousal *et al.*, 2018). O comprometimento da atividade da *ZFP36L2* durante a maturação oocitária resulta em defeitos na montagem do fuso meiótico, no alinhamento dos cromossomos, e também em acúmulo de fatores que prejudicam a ativação do genoma embrionário, o que resulta em bloqueio no desenvolvimento embrionário nesse mesmo estágio (Ramos *et al.*, 2004; Ramos, 2012; Ball *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2021). Entretanto, a maioria dos estudos apresentam esses efeitos através do nocaute ou a mutações nessa proteína, ou seja, são experimentos que levam a uma perda de função quase total da

mesma. No nosso estudo, estamos mostrando um efeito causado por uma modulação biológica, e que talvez resulte em alterações sutis na qualidade dos oócitos. Fazemos essa afirmação pois, dentre os 10 genes-alvo da ZFP36L2 que também avaliamos no oócito, apenas *KDM4C* se mostrou diferencialmente expresso em oócitos maturados em meio modificado. Ainda que os protocolos aqui testados tenham causado esse efeito sutil nos oócitos, tanto a susceptibilidade da atividade da ZFP36L2 em ser modulada pelas vias ERK1/2/MAPK (Adachi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015), quanto a importância que os estoques de RNAm maternos para a competência ao desenvolvimento (Sha *et al.*, 2020; Sha *et al.*, 2020) devem ser levados em conta ao se desenvolver protocolos de MIV que modulem essas vias.

Essa abordagem da sutileza do efeito biológico pode justificar o fato de termos observado diferenças nos níveis proteicos de ZFP36L2 apenas pela técnica de imunocitoquímica, e não por *western blotting*. Os níveis proteicos de ZFP36L2 às 9h e 19h, que foram avaliados por protocolo de imunocitoquímica, acompanharam os padrões de expressão observados em *ZFP36L2*. Esse dado descarta a possibilidade de que os menores níveis de RNAm seriam por maior síntese proteica. Logo, a hipótese levantada para as diferenças vistas no *cumulus* não se aplica para as vistas nos oócitos, ou seja, os maiores níveis oocitários de *KDM4C* podem ser devido a baixos níveis da proteína ZFP36L2, e não em menor atividade da mesma causada por fosforilação, já que *MAPKAPK2* e *YWHAZ* (uma das proteínas 14-3-3 que se ligam à ZFP36L2 quando fosforilada) também não apresentaram diferenças em seus níveis, ao contrário do que foi observado no *cumulus*. O que podemos inferir desse resultado é que parece haver um mecanismo que torna os oócitos menos susceptíveis, comparados às células do *cumulus*, a modulações dessa ordem, provavelmente um mecanismo evolutivo para proteger o gameta de alterações de ordem sutil.

Os níveis de expressão de *CPEB1* foram maiores em oócitos MII que passaram pela pré-maturação. Esse padrão de expressão foi diferente do que foi observado nas respectivas células do *cumulus*. Como já foi dito, as proteínas CPEB1 e CPEB4 alternam sua atividade reguladora durante a maturação oocitária, em ondas de poliadenilação que são chamadas de “precoce” e “tardia”. A temporalidade dessas ondas de tradução é essencial para a síntese de proteínas-chave para a progressão da meiose (Igea e Méndez, 2010). A ativação da via ERK1/2 não é essencial para regular o início da tradução mediado por CPEB1, mas CPEB4 precisa da fosforilação mediada por ERK1/2 ou Cdk1 para regular a poliadenilação durante a maturação oocitária (Guillén-Boixet *et al.*, 2016). É interessante citar que o envelhecimento em camundongos está associado com diminuição na via de tradução, que é decorrente de falhas na

atividade de CPEB1, o que prejudica a qualidade do oócito (Takahashi *et al.*, 2023). Portanto, é válido olhar com mais critério para possíveis respostas opostas ou diferentes, em células somáticas e gameta, que possam ser geradas por ativação de uma via comum a ambos, assim como estudar de forma mais aprofundada o quanto isso afeta a qualidade e competência no COC como um todo.

Com este estudo, podemos concluir que as células somáticas são muito mais susceptíveis à modulação com CNP e AREG do que o oócito. Isso pode ser um mecanismo evolutivo de proteção que, por um lado, é extremamente benéfico. Por outro lado, não podemos esquecer que, nos oócitos, avaliamos bem menos genes associados à via de tradução de RNAm do que nas células do *cumulus*, então não podemos concluir que essa via não tenha sido modulada, já que já foi demonstrado que AREG estimula a via traducional por genes que não foram avaliados neste estudo (Chen *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram, por exemplo, que a modulação do GMPc e ativação de EGFR geram uma mobilização intensa na expressão gênica no *cumulus*, enquanto nos oócitos essa mudança é sutil. Futuros estudos podem contribuir com o conhecimento de como regular vias iniciadas no compartimento somático com o objetivo de produzir efeitos mais significativos no gameta e assim, melhorar sua qualidade e competência ao desenvolvimento.

9. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

9.1. Conclusões e considerações finais gerais

Com este trabalho, pudemos verificar de uma forma mais detalhada como as características iniciais do complexo *cumulus*-oócito podem influenciar a sua resposta em variados sistemas de maturação *in vitro*. Apesar dos avanços na ciência, as biotécnicas de produção de embriões *in vitro* ainda resultam em alterações metabólicas e moleculares importantes e que causam prejuízos à qualidade dos gametas e embriões. A maturação *in vitro* é conhecida como o “gargalo” desse sistema, pois existem limitações para se mimetizar *in vitro* as características inerentes ao folículo e que são essenciais para a aquisição de competência ao desenvolvimento. Com este trabalho, observamos que mesmo os avanços na descoberta de mecanismos moleculares de competência e no desenvolvimento de protocolos que propõem suprir as deficiências que a retirada prematura do folículo gera, a biologia do COC é complexa e diferenças que podem parecer sutis aos olhos do técnico podem ser responsáveis por respostas distintas dentro do sistema *in vitro*. Concluímos que existe uma necessidade real de que a ciência básica e a aplicada trabalhem juntas no entendimento dessas diferenças para que se obtenham avanços significativos nos sistemas de MIV. Desenvolver protocolos direcionados para COCs em estágios de desenvolvimento diferentes, ou manipular o ciclo estral para se obter uma maior quantidade de folículos no mesmo estágio são estratégias que podem contribuir a melhorar os índices da PIVE.

Além dos resultados que ajudam a entender a importância das características iniciais do COC para as respostas no sistema *in vitro*, acreditamos ter colaborado com futuros estudos quando propomos um refinamento da classificação tradicional dos estágios de desenvolvimento do oócito. Estamos na era da tecnologia de imagem de alta qualidade, e precisamos começar a empregar essas ferramentas de forma ampla. Esperamos que em breve, essas tecnologias possam ser utilizadas para a seleção dos COCs previamente aos protocolos de MIV.

9.2. Conclusões e considerações específicas de cada estudo

9.2.1 Estudo 1: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a progressão meiótica e a comunicação entre *cumulus* e oócito em bovinos”.

Com este estudo, concluímos que protocolos que propõem a modulação da progressão meiose podem produzir resultados distintos em função do estágio do desenvolvimento inicial do oócito, inclusive produzindo resultados contraditórios àqueles a literatura descreve. Propostas de bloqueio meiótico parecem beneficiar oócitos em estágios mais iniciais de GV, pois como observamos, oócitos em estágios mais avançados passam por rompimento prematuro de sua comunicação com as células do *cumulus*, e por atingirem o estágio de MII de forma mais precoce, acabam permanecendo mais tempo no ambiente *in vitro*. Isso provavelmente pode acarretar em respostas associadas a envelhecimento e atresia, características que não foram avaliadas neste estudo. Esses achados nos levam a concluir que é necessário buscar desenvolvimento de tecnologias de MIV direcionadas para essas populações distintas de oócitos, a fim de que se possa explorar o melhor potencial de ambas nos sistemas de PIVE.

9.2.2. Estudo 2: “Os sistemas de pré-maturação com CNP e de maturação *in vitro* modificada modulam a expressão de genes associados aos mecanismos de tradução e degradação de RNAm no COC bovino”.

Os resultados deste estudo nos mostram que os protocolos de modulação da progressão da meiose afetam não apenas o processo meiótico em si, mas também sugerem mobilização uma considerável síntese proteica nas células do *cumulus*, considerando o aumento na expressão de diversos genes associados à tradução de RNAm nessas células. Genes ligados à degradação de transcritos também foram mais expressos, mostrando que poderia ocorrer uma modulação dos estoques de RNAm em função dos níveis de GMPc e da ativação do EGFR no *cumulus*, o que infelizmente não pudemos testar neste trabalho. No oócito, o efeito dessa modulação foi sutil, visto que pouca diferença foi observada na expressão dos genes que avaliamos neste estudo (que codificam proteínas reguladoras da extensão e o encurtamento da cauda poli(A)). Porém, os mecanismos de regulação dos estoques maternos de RNAm são bem mais complexos, e os efeitos da modulação de vias como PKA, MAPK e ERK1/2, precisam ser melhor explorados e levados em consideração no desenvolvimento de protocolos de MIV.

REFERÊNCIAS

ABBASSI, L. et al. Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular compartment at ovulation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1438, p. 1-13, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21644-z>

ADACHI, S. et al. ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 15, p. 10037-49, set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gku652>

ADONA, P.R. et al. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 389-97, mar. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.013>

AKIN, N. et al. Positive effects of amphiregulin on human oocyte maturation and its molecular drivers in patients with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, v. 37, n. 1, p. 30-43, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/deab237>

ALBERTINI, D.F.; RIDER, V. Patterns of intercellular connectivity in the mammalian *cumulus*-oocyte complex. **Microscopy Research and Technique**, v.27, n. 2, p. 125-33, fev. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270206>

ALBERTINI, D.F.; SANFINS, A.; COMBELLES, C.M. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 6, n. 4, p. 410-5, jun. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)62159-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)62159-1)

ALBUZ, F.K. et al. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, dez. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/deq246>

ANDREOU, A.Z.; HARMS, U.; KLOSTERMEIER, D. eIF4B stimulates eIF4A ATPase and unwinding activities by direct interaction through its 7-repeats region. **RNA Biology**, v. 14, n. 1, p. 113-23, jan. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259782>

APPELTANT, R. et al. Increasing the cAMP concentration during in vitro maturation of pig oocytes improves *cumulus* maturation and subsequent fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 344-352, fev. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.023>

ASSAREH, N. et al. Sequential IVM by CNP preincubation and cooperating of PGE2 with AREG enhances developmental competence of SCNT reconstructs in goat. **Scientific Reports**, v. 12, n. 4243, p. 1-14, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08238-5>

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S.J.; SIRARD, M.A. *Cumulus* cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 835-52, dez. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0248>.

BAENA, V.; TERASAKI, M. Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.1262, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37766-2>

BALL, C.B. et al. The RNA-binding protein, ZFP36L2, influences ovulation and oocyte maturation. **PLoS One**, v. 9, n. 5 (e97324), p.1-12, mai. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097324>

BELLOC, E.; MÉNDEZ, R. A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 1017-21, abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature06809>

BELLOC, E.; PIQUÉ, M.; MÉNDEZ, R. Sequential waves of polyadenylation and deadenylation define a translation circuit that drives meiotic progression. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 4, p. 665–70, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST0360665>

BETTEGOWDA, A.; LEE, K.B.; SMITH, G.W. Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 1, p. 45-

53, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/rd07156>

BOTIGELLI, R.C. et al. Supplementing in vitro embryo production media by CNP and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine *cumulus*-oocyte complexes and embryos. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 1, p. 66-75, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.01.004>

BROOK, M.; SMITH, J.W.S.; GRAY, N.K. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. **Reproduction**, v. 137, n. 4, p. 595-617, abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-08-0524>

BROOKS, S.A.; CONNOLLY, J.E.; RIGBY, W.F.C. The role of mRNA turnover in the regulation of tristetraprolin expression: evidence for an extracellular signal-regulated kinase-specific, AU-rich element-dependent, autoregulatory pathway. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 12, p. 7263-71, jun. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7263>

CAMPEN, K.A. et al. The *in-vitro* effects of cAMP and cGMP modulators on inter-cellular dye transfer and gene expression levels in rat *cumulus* cell-oocyte complexes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 420, p. 46-56, jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.025>

CHEN, L. et al. Covalent linkage between proteins of the inter-alpha-inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p.19409-14, ago. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19409>

CHEN, J. et al. Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 1415-23, dez. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb2873>

CHO, W.K.; STERN, S.; BIGGERS, J.D. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 187, n. 3, p. 383-386, mar. 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jez.1401870307>

CHOI, T. et al. Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 10, p. 4730-5, mai. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4730>

CHOUSAL, J.N. et al. Chromatin modification and global transcriptional silencing in the oocyte mediated by the mRNA decay activator ZFP36L2. **Developmental Cell**, v. 44, n. 3, p. 392–402.E7, Fev 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.006>

CHRESTENSEN, C.A. et al. MAPKAP Kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on *in vivo* sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10176-84, mar. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M310486200>

CLARK, A. et al. Post-transcriptional gene regulation by MAP kinases via AU-rich elements. **Frontiers in Bioscience (Landmark Ed.)**, v. 14, n. 3, p. 847-71, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/3282>

CLARKE, H.J. Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. In: KUBIAK, J.Z. (Ed.). **Mouse Development. Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 55, Springer, Berlin, Heidelberg, jan. 2012, cap. 1, p. 1-21. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-30406-4_1

CLARKE, H.J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, v. 7, n. jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wdev.294>.

CLARKE, H.J. Transzonal projections: Essential structures mediating intercellular communication in the mammalian ovarian follicle. **Molecular Reproduction & Development**, v. 89, n. 11, p. 509-525, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.23645>

CLEMENT, S.L. et al. Phosphorylation of tristetraprolin by MK2 impairs AU-rich element mRNA decay by preventing deadenylase recruitment. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 2, p. 256-66, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.00717-10>

COLLART, M.A. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA**, v. 7, n. 4, p. 438-54, jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wrna.1332>

COLEMAN, T.R.; DUNPHY, W.G. Cdc2 regulatory factors. **Current Opinions on Cell Biology**, v. 6, n. 6, p. 877-82, dez. 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90060-4)

CONTI, M. et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 715-23, abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2005-0185>

CONTI, M. et al. Translational Control in the Germ Line. In: MENON, K.M.J.; GOLDSTROHM, A.C. (Ed.). **Post-transcriptional Mechanisms in Endocrine Regulation**. Springer, Cham. 2016, cap. 7, p. 129-156. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-25124-0_7.

CRAIG, A.W.B. et al. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. **Nature**, v. 392, n. 6675, p. 520-3, abr. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/33198>

DE BEM, T.H. et al. Viable calves produced by somatic cell nuclear transfer using meiotic-blocked oocytes. **Cell Reprograming**, v. 13, n. 5, p. 419-29, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/cell.2011.0010>

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J.J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Developmental Biology**, v. 229, n. 1, p. 224-36, jan. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9947>

DE LA FUENTE, R. et al. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. **Developmental Biology**, v. 275, n. 2, p. 447-58, nov. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.028>

DEL COLLADO, M. et al. *In vitro* maturation impacts *cumulus*-oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v. 154, n. 6, p. 881-93, dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-17-0134>

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**, v. 7, n. 2645, p. 1-13, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02467-9>

DIECI, C. et al. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 3, p. 68, set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110577>

DIECI, C. et al. Differences in *cumulus* cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve *in-vitro* bovine embryo production. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 882-97, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw055>

DIELEMAN, S.J. et al. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 5-20, jan. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00655-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00655-0)

DONG, J. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v. 383, n. 6600, p. 531-5, out. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/383531a0>.

DOWNS, S.M.; SCHROEDER, A.C.; AND EPPIG, J.J. Developmental capacity of mouse oocytes following maintenance of meiotic arrest *in vitro*. **Gamete Research**, v. 15, p. 305-316, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1120150404>

EGBERT, J.R. et al. Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. **Development**, v. 141, n. 18, p. 3594-604, set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.112219>

EGBERT, J.R. et al. Luteinizing hormone causes phosphorylation and activation of the cGMP phosphodiesterase PDE5 in rat ovarian follicles, contributing, together with PDE1 activity, to the resumption of meiosis. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 5, p. 110, mai. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.135897>

EGBERT, J.R.; YEE, S.P.; JAFFE, L.A. Luteinizing hormone signaling phosphorylates and activates the cyclic GMP phosphodiesterase PDE5 in mouse ovarian follicles, contributing an additional component to the hormonally induced decrease in cyclic GMP that reinitiates meiosis. **Developmental Biology**, v. 435, n. 1, p. 6-14, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.008>

EL-HAYEK, S.; CLARKE, H.J. Follicle-stimulating hormone increases gap junctional communication between somatic and germ-line follicular compartments during murine oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 2, p. 47, ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.129569>

EL-HAYEK, S. et al. Mammalian oocytes locally remodel follicular architecture to provide the foundation for germline-soma communication. **Current Biology**, v. 28, n. 7, p. 1124-31, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.039>

ELVIN, J.A. et al. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 1018-34, jun. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0309>.

EPPIG J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **BioEssays**, v. 13, n. 11, p. 569-74, nov. 1991, Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bies.950131105>

FAN, H.Y.; SUN, Q.Y. Oocyte meiotic maturation. In: LEUNG, P.C.K.; ADASHI, E.Y. (eds) **The Ovary**. Academic Press, 2019, p. 181-203. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00012-1>.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 4, 437-42, dez. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420410>

FAIR, T. et al. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes in vitro using butyrolactone I: Effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 375-86, jul. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.10096>

FENGER-GRØN, M. et al. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. **Molecular Cell**, v. 20, n. 6, p. 905-15, dez. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.031>

FERREIRA, E.M. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 145, n. 1, p. 76-80, jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.03.016>

FILATOV, M.; KHRAMOVA, Y.; SEMENOVA.,M. Molecular mechanisms of prophase I meiotic arrest maintenance and meiotic resumption in mammalian oocytes. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1519-1537, nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1933719118765974>

FLEMR, M. et al. P-body loss is concomitant with formation of a messenger RNA storage domain in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 5, p. 1008-17, mai. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082057>

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-32, fev. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.225>

FRANCIOSI, F. et al. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains *gap* junction-mediated communication in bovine *cumulus*-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 3 (61), p. 1-9, set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118869>

FUSHII, M. Reestablishment of transzonal projections and growth of bovine oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 67, n. 5, p. 300-306, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-036>

GALLI, C. Achievements and unmet promises of assisted reproduction technologies in large animals: a personal perspective. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 614-621, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR1005>

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 23-31, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD10225>

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027>

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-77, mar. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>

GILCHRIST, R.B. et al. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. 143-57, nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-15-0606>

GORDO, A.C. et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and development**, v. 59, n. 1, p. 106-114, mar. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1012>

GOSDEN, R.; LEE, B. Portrait of an oocyte: our obscure origin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 973-83, abr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI41294>.

GRAF, A. et al. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **PNAS**, v. 111, n. 11, p. 4139-44, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1321569111>

GUILLÉN-BOIXET, J. et al. CPEB4 is regulated during cell cycle by ERK2/Cdk1-mediated phosphorylation and its assembly into liquid-like droplets. **Elife**, v. 5, n. e19298, p. 1-26, nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.19298>

HAKE, L.E.; RICHTER, J.D. CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 617-27, nov. 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90547-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90547-9)

HAKE, L.E.; MENDEZ, R.; RICHTER, J.D. Specificity of RNA binding by CPEB: requirement for RNA recognition motifs and a novel zinc finger. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 2, p.685-93, fev. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.18.2.685>

HAO, X. et al. Epidermal growth factor-mobilized intracellular calcium of *cumulus* cells decreases natriuretic peptide receptor 2 affinity for natriuretic peptide type C and induces oocyte meiotic resumption in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 2 (45), p. 1-9, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140137>

HAYAKAWA K.; TANAKA, S. Oocyte-specific linker histone H1foo interacts with Esrrb to induce chromatin decondensation at specific gene loci. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 561, n. 5, p. 165-171, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.05.033>

HERBERT, M. et al. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 1023–1025, nov. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb1062>

HINCKLEY, M. et al. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. **Developmental Biology**, v. 287, n. 2, p. 249 – 261, nov. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.019>

HSIEH, H.H. et al. The functional characterization of phosphorylation of tristetraprolin at C-terminal NOT1-binding domain. **Journal of Inflammation**, v. 18, n. 22, p. 1-16, jun. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12950-021-00288-2>

HUOT, J. et al. Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27. **European Journal of Biochemistry**, v. 227, n. 1-2, p. 416-27, jan. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20404.x>

IETS. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: Embryo Technology Newsletter, v. 40, n. 4, 2022.

IGEA, A.; MÉNDEZ, R. Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 13, p. 2182-93, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.111>

IRVING-RODGERS, H.F. et al. Composition and morphology of the follicular basal lamina during atresia of bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 97-106, jan. 2002 Jan. PMID: 11869191.

JIA, Z.; WANG, X. Effects of C-type natriuretic peptide on meiotic arrest and developmental competence of bovine oocyte derived from small and medium follicles. **Scientific Reports**, v. 10, n. 18213, p. 1-8, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75354-5>

JIA, Z.; YANG, X.; LIU, K. Treatment of cattle oocytes with C-type natriuretic peptide before *in vitro* maturation enhances oocyte mitochondrial function. **Animal Reproduction Science**, v. 225, n. 106685, p. 1-11, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106685>

JOHNSON, B.A. et al Cytoplasmic localization of tristetraprolin involves 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. **The Journal of Biologic Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 18029–18036, mai. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(77\)90098-3](https://doi.org/10.1016/0306-4492(77)90098-3)

KALOUS, J. et al. Importance of ERK1/2 in regulation of protein translation during oocyte meiosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 1-21, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19030698>

KASTROP, P.M.M. et al. The effects of α -amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, n. 3, p. 249-54, mar. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280306>

KERR, J.B., MYERS, M., ANDERSON, R.A. The dynamics of the primordial follicle reserve. **Reproduction**, v. 146, n. 6, p.205-215, out. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-13-0181>

KHAN, D.R. et al. Characterization of FSH signalling networks in bovine *cumulus* cells: a perspective on oocyte competence acquisition. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 9, p. 668-701, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gav032>

KHATIR, H.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 50, n. 6, p. 917-29, out. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00196-4)

KIDDER, G.M., VANDERHYDEN, B.C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 399-413, abr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/y10-009>.

KIM, K.H.; LEE, K.A. Maternal effect genes: findings and effects on mouse embryo development. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 41, n. 2, p. 47–61, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5653/cerm.2014.41.2.47>

KIM, J.H.; RICHTER, J.D. RINGO/cdk1 and CPEB mediate poly(A) tail stabilization and translational regulation by ePAB. **Genes & Development**, v. 21, n. 20, p. 2571-9, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.1593007>

KITAGAWA, M. et al. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. **Oncogene**, v. 8, n. 9, p. 2425-32, set. 1993. PMID: 8395680.

KRISHER, R.L. In Vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 393-417, jan. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103647>

LABRECQUE, R. et al. Chromatin remodelling and histone mRNA accumulation in bovine germinal vesicle oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 6, p. 450-62, jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.22494>

LABRECQUE, R. et al. Gene expression analysis of bovine oocytes with high developmental competence obtained from FSH-stimulated animals. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 6, p. 428-40, jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.22177>

LAGUTINA, I. et al. Kinetics of oocyte maturation and subsequent development of IVF, parthenogenetic, and NT bovine embryos after meiotic inhibition with roscovitine. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, n. 2, p. 113-9, jun. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/153623002320253292>

LAITINEN M. et al. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. **Mechanisms of Development**, v. 78, n. 1-2, p. 135-40, nov. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(98\)00161-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(98)00161-0)

LEFEBVRE, C. et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 4, p. 603–13, mai. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200202052>

LEONI, G.G. et al. Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4 (e0124911), p. 1-25, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124911>

LI, H.J. et al. Extending prematuration with cAMP modulators enhances the *cumulus* contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via *gap* junctions. **Human Reproduction**, v. 31, n. 4, p. 810-21, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/dew020>

LI, R.; ALBERTINI, D.F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 141-52, mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm3531>

LIU, C. et al. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. **Nature Communications**, v. 6, n. 6934, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms7934>

LIU, X. et al. Tristetraprolin functions in cytoskeletal organization during mouse oocyte maturation. **Oncotarget**, v. 7, n. 33, p. 53330-8, jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10755>

LIU, Y. et al. Eukaryotic translation initiation factor eIF4G2 opens novel paths for protein synthesis in development, apoptosis and cell differentiation. **Cell Proliferation**, v. 56, n. 3 (e13367), p. 1-14, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cpr.13367>

LODDE, V. et al. Role of *gap* junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 9, p. 1219-26, set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0061-7>

LODDE, V. et al. Accumulation of chromatin remodelling enzyme and histone transcripts in bovine oocytes. In: KLOC, M. (Ed.). **Oocytes. Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 63, Springer, Cham, cap. 11, p. 223-55, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_11

LODDE, V. et al. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: Interplay with *gap* junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 6, p. 740-9, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20639>

LODDE, V. et al. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 915-24, mai. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20824>

LONERGAN, P. et al. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Molecular Reproduction & Development**, v. 57, n. 2, p. 204-9, out. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<204::AID-MRD12>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<204::AID-MRD12>3.0.CO;2-N)

LORD, M.S. et al. The inter- α -trypsin inhibitor family: versatile molecules in biology and pathology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 68, n. 12, p. 907-927, dez. 2020. Disponível em: doi: 10.1369/0022155420940067

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**, v. 85, n. 6, p. 1252-59, dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092858>

LUCIANO, A.M. et al. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-*cumulus* cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 465-72, fev. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020644>

LUCIANO, A.M. et al. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a Co-culture system with intact *cumulus*-oocyte complexes: Role of *cumulus* cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 3, p. 389-97, jul. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20304>

LUCIANO, A.M.; SIRARD, M.A. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. **Biology of Reproduction**, v. 98, n. 2, p. 162-9, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox149>

LUCIANO, A.M. et al. The variable success of in vitro maturation: can we do better? **Animal Reproduction**, v. 15, suppl. 1, p. 727-736, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0021>

MACAULAY, A.D. et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4 (90), p. 1-12, out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119867>

MACAULAY, A.D. et al. *Cumulus* cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 1, p. 16, jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.127571>

MARCHESE, F.P. et al. MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27590-600, set. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.136473>

MAHROUS, E.; YANG, Q.; CLARKE, H.J. Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. **Reproduction**, v. 144, n. 2, p. 177-85, ago. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-12-0113>

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. The influence of *cumulus*-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 911-22, mar. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00453-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00453-8)

MCGREW, L.L.; RICHTER, J.D. Translational control by cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation: characterization of cis and trans elements and regulation by cyclin/MPF. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 11, p. 3743-51, nov. 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07587.x>

MEHLMANN, L.M. Signaling for Meiotic Resumption in Granulosa Cells, *Cumulus* Cells, and Oocyte. In: COTICCHIO, G.; ALBERTINI, D.; DE SANTIS, L. (eds) **Oogenesis**. Springer, London. 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3_12

MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 36-41, set. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199809\)51:1<36::AID-MRD4>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<36::AID-MRD4>3.0.CO;2-X)

MERMILLOD, P. et al. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity.

Molecular Reproduction & Development, v. 55, n. 1, p. 89-95, jan. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200001\)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200001)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M)

MÉTHOT, N.; SONG, M.S.; SONENBERG, N. A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 10, p. 5328-34, out. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5328>

MORA, J.M. et al. Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 5, p. 1-14, fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096156>

MORISHITA, N. et al. Novel CAPA-IVM using dibutyryl-cAMP (DBCAMP) and C-type natriuretic peptide (CNP): bovine model study for human IVM of oocytes. **Fertility and Sterility**, v. 14, n. 3, p. e353, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.1054>

MOUROT, M. et al. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 11, p. 1367-79, nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20585>

NORRIS, R.P. et al. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for *gap* junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 655-62, nov. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0288>

NORRIS, R.P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869-78, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.035238>

NOVOA, I. et al. Mitotic cell-cycle progression is regulated by CPEB1 and CPEB4-dependent translational control. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 447-56, mai. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb2046>

OH, B. et al. Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition. **Development**, v. 127, n. 17, p. 3795-803, set. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.127.17.3795>

OH, J.S.; HAN, S.J.; CONTI, M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. **Journal of Cellular Biology**, v. 188, 2, p. 199-207, jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200907161>

OZTURK, S. et al. Superovulation alters embryonic poly(A)-binding protein (*Epab*) and poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1 (*Pabpc1*) gene expression in mouse oocytes and early embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 3, p. 375-83, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD14106>

PARK, J.Y. et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682-4, jan. 2004. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1092463>

PAULSON, R.J. et al. Can we modify assisted reproductive technology practice to broaden reproductive care access? **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 5, p. 1138-43, mai. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.03.013>

PILZ, R.B.; CASTEEL, D.E. Regulation of gene expression by cyclic GMP. **Circulation Research**, v. 93, n. 11, p. 1034-46, nov. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000103311.52853.48>

PIQUÉ, M. et al. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 434-48, fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.038>

PIRINO, G.; WESCOTT, M.P.; DONOVAN, P.J. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. **Cell Cycle**, v. 8, n. 4, p. 665-70, fev. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.8.4.7846>

POTTER, LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. **Cell Signaling**, v. 23, n. 12, p. 1921-6, dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.09.001>.

PROCHÁZKA, R. et al. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig *cumulus* cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 425-35, abr. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0418>

PROCHAZKA, R.; BLAHA, M.; NEMCOVA, L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin- induced meiotic resumption and *cumulus* cell expansion in the pig. **Reproduction**, v. 144, n. 5, p. 535-46, nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-12-0191>

RADFORD, H.E.; MEIJER, H.A.; DE MOOR, C.H. Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1779, n. 4, p. 217-29, abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.02.002>

RAMOS, S.B.V. Characterization of DeltaN-Zfp36l2 mutant associated with arrest of early embryonic development and female infertility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 16, p. 13116–27, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330837>

RAMOS, S.B.V. et al. The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp36l2 is crucial for female fertility and early embryonic development. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4883-93, out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.01336>

REYES, J.M.; ROSS, P.J. Cytoplasmic polyadenylation in mammalian oocyte maturation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 7, n. 1, p. 71-89, jan-fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wrna.1316>

RICHANI, D. et al. Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 5, p. 422-35, mai. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.22307>

RICHANI, D.; GILCHRIST, R.B. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 1, p. 1-14, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029>.

RICHTER, J. D. CPEB: a life in translation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 6, p. 279-85, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.04.004>

RIZOS, D. et al. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 320–7, jul. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.10138>

ROBERT, C. Nurturing the egg: the essential connection between *cumulus* cells and the oocyte. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 34, n. 2, p. 149-159, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD21282>

ROUHOLLAHI VARNOSFADERANI, S. et al. Granulosa secreted factors improve the developmental competence of *cumulus* oocyte complexes from small antral follicles in sheep. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229043, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229043>

RUGG, M.S. et al. Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto hyaluronan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 27, p. 25674-86, jul. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M501332200>

SAENZ-DE-JUANO, M.D. et al. DNA methylation and mRNA expression of imprinted genes in blastocysts derived from an improved *in vitro* maturation method for oocytes from small antral follicles in polycystic ovary syndrome patients. **Human Reproduction**, v. 34, n. 9, p. 1640-49, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/dez121>

SALUSTRI, A. et al. PTX3 plays a key role in the organization of the *cumulus* oophorus extracellular matrix in in vivo fertilization. *Development*, v. 131, n. 7, p. 1577-86, abr. 2004. Disponível em: 10.1242/dev.01056.

SANDUJA, S.; BLANCO, F.F.; DIXON, D.A. The roles of TTP and BRF proteins in regulated mRNA decay. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA**, v. 2, n. 1, p. 42-57, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wrna.28>

SANGALLI, J.R. et al. Characterization of histone lysine β -hydroxybutyrylation in bovine tissues, cells, and *cumulus*-oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 89, n. 9, p. 375-98, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.23630>

SHA, Q.Q. et al. CNOT6L couples the selective degradation of maternal transcripts to meiotic cell cycle progression in mouse oocyte. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 24, p. e99333, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/embl.201899333>

SHA, Q.Q. et al. Dynamics and clinical relevance of maternal mRNA clearance during the oocyte-to-embryo transition in humans. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4917, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18680-6>

SHA, Q.Q. et al. Characterization of zygotic genome activation-dependent maternal mRNA clearance in mouse. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 2, p. 879–94, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1111>

SHIMADA, M. et al. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in *cumulus* oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, p. 1352-65, jun. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2005-0504>

SIEMER, C. et al. Analysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 12, p. 1208-19, dez. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.21096>

SIRARD, M.A. Folliculogenesis and acquisition of oocyte competence in cows. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 449-454, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0038>

SOARES, A.C.S. et al. Steroid hormones interact with natriuretic peptide C to delay nuclear maturation, to maintain oocyte-*cumulus* communication and to improve the quality of *in vitro*-produced embryos in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 11, p. 2217-24, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD16320>

SOARES, A.C.S. et al. Characterization and control of oocyte large-scale chromatin configuration in different cattle breeds. **Theriogenology**, v. 141, p. 146-52, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.020>

SOLC, P. et al. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 317, n. 1, p. 260-269, mai. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.028>

SOMFAI, T. et al. Meiotic arrest maintained by cAMP during the initiation of maturation enhances meiotic potential and developmental competence and reduces polyspermy of IVM/IVF porcine oocytes. **Zygote**, v. 11, n. 3, p. 199-206, ago. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0967199403002247>.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 731-45, fev. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M.T.; THOMPSON, J.G. Effect of pre-maturation with C-type natriuretic peptide and 3-isobutyl-1-methylxanthine on *cumulus*-oocyte communication and oocyte developmental competence in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 202, p. 49-57, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.01.007>

STERNLICHT, A.L.; SCHULTZ, R.M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, n. 2, p. 191-200, fev. 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jez.1402150209>

STOECKLIN, G. et al. MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 6, p. 1313-24, mar. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600163>

SU, Y.Q. et al. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 302, n. 1, p. 104-17, fev. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.008>

SU, YQ t al., Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse *cumulus* cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in *cumulus* cells. **Development**, v. 135, n. 1, p. 111-121, ja. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.009068>

SUGIMURA, S. et al. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on *gap* junction-mediated metabolite supply. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 6, p. 499-513, jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gau013>

SUGIMURA S. et al. Effect of pre-in vitro maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte developmental competence in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 233-241, jun. 2018. Disponível em: [10.1262/jrd.2018-009](https://doi.org/10.1262/jrd.2018-009)

SUK, F.M. et al. ZFP36L1 and ZFP36L2 inhibit cell proliferation in a cyclin D-dependent and p53-independent manner. **Scientific Reports**, v. 8, n. 2742, p. 1-13, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21160-z>

SUSOR, A. et al. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR–eIF4F pathway. **Nature Communications**, v. 6, n. 6078, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms7078>

SUSOR, A.; KUBELKA, M. Translational regulation in the mammalian oocyte. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 63, p.257-295. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_12

SVOBODA, P.; FRANKE, V.; SCHULTZ, R.M. Sculpting the transcriptome during the oocyte-to-embryo transition in mouse. **Current Topics of Developmental Biology**, v. 113, p. 305-49, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.06.004>

TAKAHASHI, N. et al. CPEB1-dependent disruption of the mRNA translation program in oocytes during maternal aging. **Nature Communications**, v. 14, n. 416, p. 1-17, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35994-3>

THOMAS, R.E.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Bovine *cumulus* cell-oocyte *gap* junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic 3',5'-monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 548-56, mar. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021204>

TOEUF, B.D. et al. ARE-mediated decay controls gene expression and cellular metabolism upon oxygen variations. **Scientific Reports**, v. 8, n. 5211, p. 1-17, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23551-8>

THOMAS, R.E. et al. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1142-1149, out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024828>

TURATHUM, B.; GAO, E.M.; CHIAN, R.C. The function of *cumulus* cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2292, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10092292>

VANDERHYDEN, B.C.; MACDONALD, E.A. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1296-301, dez. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1296>

VOGEL, K.U. et al. The RNA-binding proteins Zfp36l1 and Zfp36l2 enforce the thymic β -selection checkpoint by limiting DNA damage response signaling and cell cycle progression. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 7, p. 2673-85, out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600854>

VUONG, L.N. et al. Live births after oocyte in vitro maturation with a prematuration step in women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 37, n. 2, p. 347-57, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01677-6>

WALSER, C.B.; LIPSHITZ, H.D. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 21, n. 4, p. 431-43, ago. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.03.003>

WANG, H.; DEY, S. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nature Reviews: Genetics**, v. 7, p. 185–199, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg1808>

WANG, K.T. et al. Functional regulation of Zfp36l1 and Zfp36l2 in response to lipopolysaccharide in mouse RAW264.7 macrophages. **Journal of Inflammation**, v. 12, n. 42, p. 1-13, jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0088-x>

WANG, C.; ROY, S.K. Expression of E-cadherin and N-cadherin in perinatal hamster ovary: possible involvement in primordial follicle formation and regulation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2319-30, mai. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2009-1489>

WASSARMAN, P.M.; LITSCHER, E.S. Biogenesis of the mouse egg's extracellular coat, the zona pellucida. **Current Topics of Developmental Biology**, v. 102; p.243-66, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416024-8.00009-X>

WEILL, L. et al. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 19, n. 6, p. 577-85, jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2311>

WIGGLESWORTH, K, et al. Transcriptomic diversification of developing *cumulus* and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 1, p.1-14, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121756>

WILHELM, J.E. et al. Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in *Drosophila* oocytes. **Journal of Cellular Biology**, v. 18, n. 3, p. 427-40, fev. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.427>

WINTERHAGER, E.; KIDDER, G.M. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 3, p. 340-352, mai. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv007>

WU, F. et al. ZFP36L2 regulates myocardial ischemia/reperfusion injury and attenuates mitochondrial fusion and fission by LncRNA PVT1. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 614, p. 1-13, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03876-5>

XI, G. et al. Natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) localized in bovine oocyte underlies a unique mechanism for C-type natriuretic peptide (CNP)-induced meiotic arrest. **Theriogenology**, v. 106, p. 198-209, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.003>

XI, G. et al. The mRNA-destabilizing protein Tristetraprolin targets “meiosis arrester” *CNP* mRNA in mammalian preovulatory follicles. **PNAS**, v. 118, n. 22 (e2018345118), p. 1-8, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2018345118>

YEN, S.Y. et al. Expression and activation of mitogen-activated protein kinases in matured porcine oocytes under thermal stress. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 5, p. 388-94, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-004>

YI, H. et al. PABP cooperates with the CCR4-NOT complex to promote mRNA deadenylation and block precocious decay. **Molecular Cell**, v. 70, n. 6, p. 1081-88, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.009>

YU, F.Q. et al. Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. **Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 1, p. 85-96, jul. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05955>

ZAMAH, A.M.; et al.. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. **Human Reproduction**, v. 25, n. 10 p. 2569-78, out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/deq212>

ZHANG, M. et al. Granulosa cell ligand CNP and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 366-9, out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1193573>

ZHANG, M. et al. Estradiol promotes and maintains *cumulus* cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4377-85, nov. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2011-1118>

ZHANG, M. et al. Meiotic arrest with roscovitine and follicular fluid improves cytoplasmic maturation of porcine oocytes by promoting chromatin de-condensation and gene transcription. **Scientific Reports**, v. 7, n. 11574, p. 1-15, set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11970-y>

ZHANG, T. et al. Effects of pre-incubation with C-type natriuretic peptide on nuclear maturation, mitochondrial behavior, and developmental competence of sheep oocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 1, p. 200-6, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.054>

ZHANG, T. et al. Effect of C-type natriuretic peptide pretreatment on in vitro bovine oocyte maturation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 53, n. 3, p. 199-206, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0101-6>

ZHANG, Y. et al. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 12, p. 3777-86, dez. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dvdy.21799>

ZHANG, Y.L. et al. ERK1/2 activities are dispensable for oocyte growth but are required for meiotic maturation and pronuclear formation in mouse. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 42, n. 9, p. 477-85, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.07.004>

ZHENG, W. et al. Biallelic variants in *ZFP36L2* cause female infertility characterised by recurrent preimplantation embryo arrest. **Journal of Medical Genetics**, v. 59, n. 9, p. 850-7, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-107933>

ZHENWEI, J.; XIANHUA, Z. Pre-IVM treatment with C-type natriuretic peptide in the presence of cysteamine enhances bovine oocytes antioxidant defense ability and developmental competence *in vitro*. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 3, p. 173-9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22099/IJVR.2019.5347>

ZHOU, Z.; FAN, H.; SHI, R. et al. A novel homozygous variant in ZFP36L2 cause female infertility due to oocyte maturation defect. **Clinical Genetics**. Mai. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cge.14362>