UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELLA MAMEDE ANDRADE

**Vesículas secretadas por células, proteínas e miRNAs
associados à competência oocitária em bovinos: um modelo
retrospectivo no microambiente folicular**

**Pirassununga
2018**

GABRIELLA MAMEDE ANDRADE

**Vesículas secretadas por células, proteínas e miRNAs
associados à competência oocitária em bovinos: um modelo
retrospectivo no microambiente folicular**

Versão corrigida

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

Departamento: Medicina Veterinária

Área de Concentração: Biociência
Animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin

Coorientador: Dr. Juliano Coelho da
Silveira

**Pirassununga
2018**

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

A553v Andrade, Gabriella Mamede
Vesículas secretadas por células, proteínas e
miRNAs associados à competência oocitária em
bovinos: um modelo retrospectivo no microambiente
folicular / Gabriella Mamede Andrade ; orientador
Felipe Perecin ; coorientador Juliano Coelho da
Silveira. -- Pirassununga, 2018.
175 f.

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

1. Reprodução animal. 2. Oócitos. 3. Folículo
ovariano. 4. MicroRNAs. 5. Bovinos. I. Perecin,
Felipe, orient. II. da Silveira, Juliano Coelho,
coorient. III. Título.

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 74135 - 7749071 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Gabriella Mamede Andrade no Programa: Biociência Animal, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 30 dias do mês de novembro de 2017, no(a) Anfiteatro do CAEP realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Gabriella Mamede Andrade, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Vesículas secretadas por células, proteínas e miRNAs associados à competência oocitária em bovinos: um modelo retrospectivo no microambiente folicular"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Felipe Perecin	Presidente	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Claudia Lima Verde Leal	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
José Buratini Júnior	Titular	IB-UNESP - Externo	<u>APROVADA</u>
Marcos Roberto Chiaratti	Titular	UFSCar - Externo	<u>APROVADA</u>
Aline Silva Mello Cesar	Titular	Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz [assinatura], lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 30 dias do mês de novembro de 2017.

[assinatura]
Claudia Lima Verde Leal

[assinatura]
José Buratini Júnior

[assinatura]
Marcos Roberto Chiaratti

[assinatura]
Aline Silva Mello Cesar

[assinatura]
Felipe Perecin
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 05.12.2017 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Biociência Animal.

[assinatura]
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profª. Drª. Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

AGRADECIMENTOS

Ao longo do meu doutorado muitas pessoas colaboraram com o meu trabalho e com o meu crescimento profissional, serei eternamente grata a vocês e saibam, que têm um pouco de cada um de vocês nessa tese e em mim!

Agradeço, de forma especial, ao meu orientador **Prof. Dr. Felipe Perecin** por tudo que aprendi com você e graças a você. Agradeço ainda a atenção, dedicação, paciência e incentivo, que foram com certeza, fundamentais durante esse trabalho. E ao meu coorientador **Dr. Juliano Coelho da Silveira**, você foi essencial durante este trabalho, muito obrigada pela confiança, pela ajuda, pelas idéias e pelos conhecimentos divididos.

Agradeço imensamente também:

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meireles**, **Dra. Fabiana Bressan** a ajuda e colaboração de vocês foi fundamental.

À **USP** e a **FZEA** agradeço a estrutura física para a realização deste trabalho e a disponibilidade de **funcionários e técnicos**.

À **CAPES**, a **FAPESP** pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

À **Colorado State University** e ao **Prof. Dr. Gerrit J. Bouma** obrigada pela oportunidade de fazer o intercâmbio, uma experiência profissional e pessoal indescritível.

Aos colaboradores internacionais deste trabalho **Dr. Dawid Tesfaye**, **Dr. Samuel Gebremedhn** e **Claudia Perini**, a ajuda de vocês engrandece esse trabalho.

Aos meus **amigos** e companheiros de laboratório: **Maite, Ju, Rafa, Deba, Ana, Alessandra, Rô, Helena, Marina, Naira, Ramon, Hugo, Mavi, Dewison, Aline, Laís, Pedrinho, Monalisa, Mançanares, Arina, Kelly, Fer, Léo** e estagiários, é muito bom trabalhar com vocês. Obrigada pela ajuda diária, pelos ensinamentos e também pelos momentos de diversão.

Aos **meus amigos**, aos **meus familiares**, à **Marcella**, ao **Andre Jr**, à **Sofia** e ao **Ricardo** saber que tenho vocês me traz paz, amor e felicidade.

Aos **meus pais** por toda a ajuda e amor incondicional.

Por fim, a todos que de alguma maneira me ajudaram e fizeram parte desta trajetória, muito obrigada!

DEDICATÓRIA

Àqueles que sempre
fazem tudo por mim
Viviane e Marcelo.

RESUMO

ANDRADE, G. M. **Vesículas secretadas por células, proteínas e miRNAs associados à competência oocitária em bovinos: um modelo retrospectivo no microambiente folicular.** 2018. 175f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia bastante difundida mundialmente. O Brasil, em 2015, foi responsável por aproximadamente 67% dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo (PERRY, 2014). Embora essa tecnologia seja bastante utilizada, é de grande interesse para o mercado desenvolver estratégias que levem ao maior aproveitamento dos oócitos obtidos e compreender os mecanismos, dentro do ambiente folicular, que determinam a competência oocitária. O microambiente folicular é fundamental para o crescimento e a aquisição da competência oocitária, tornando o oócito apto a desenvolver-se e manter o embrião até a transição materno embrionária. Para tanto, os componentes foliculares – células da granulosa, células do cumulus, oócito e líquido folicular – precisam trabalhar em unidade, visto que possuem uma relação de interdependência. Dentro dos mecanismos de comunicação existentes no ambiente folicular estão as vesículas secretadas por células, chamadas vesículas extracelulares, que foram descritas no líquido folicular, contendo material bioativo como proteínas, lipídios e RNAs, incluindo os microRNAs. Contudo, os componentes do ambiente folicular podem refletir na qualidade do oócito que será produzido e a hipótese geral deste trabalho é de que os miRNAs presentes no ambiente folicular regulam vias de sinalização importantes para o desenvolvimento oocitário e que os miRNAs e ou RNAs mensageiros presentes nas células foliculares podem ser explorados como importantes ferramentas para o diagnóstico da qualidade oocitária. O primeiro estudo determinou perfis transcricionais de miRNAs em células da granulosa, em complexos cumulus-oócito e em vesículas extracelulares derivadas destas células e também do fluido folicular. Além de conhecer a origem e o papel dos miRNAs no ambiente folicular, estes perfis de expressão indicaram a regulação no ambiente folicular da via de sinalização da PI3K-Akt. No segundo estudo, componentes desta via de sinalização foram então determinados em células foliculares associadas a oócitos de alta ou baixa competência ao desenvolvimento. Os resultados demonstram que a ativação da via PI3K-Akt em células foliculares correlaciona-se à maior competência oocitária; de modo oposto, a menor atividade desta via nas células foliculares está relacionada à reduzida competência oocitária. Nos estudos três e quatro, um conjunto de experimentos foram realizados para determinar o perfil de microRNAs e RNAs mensageiros em células do cumulus

associadas a oócitos de alta ou baixa competência ao desenvolvimento. Buscou-se esclarecer alguns dos mecanismos responsáveis pela melhor qualidade oocitária e levar a identificação de biomarcadores de qualidade oocitária permitindo o avanço e o desenvolvimento de novas ferramentas para intensificar a produção *in vitro* de embriões bovinos. Por fim, estes resultados demonstram respostas integradas entre oócitos e células foliculares durante o desenvolvimento folicular e o processo de aquisição de competência oocitária e identificaram marcadores de qualidade oocitária.

Palavras-chave: Ambiente folicular. Bovinos. Células do cumulus. Vesículas extracelulares. MiRNAs. PI3K-Akt. Produção *in vitro* de embriões. Qualidade oocitária.

ABSTRACT

ANDRADE, G. M. **Cell secreted vesicles, proteins and miRNAs associated to oocyte competence in bovine: a retrospective model in the follicular microenvironment.** 2018. 175p. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

In vitro embryo production of is a widespread biotechnology worldwide. In 2015 Brazil was responsible for approximately 67% of bovine embryos produced *in vitro* in the world (PERRY, 2014). Although widely used, to develop strategies that lead to better use of oocytes and understand the mechanisms (in follicular microenvironment) that determine oocyte competence is of great interest to national market. The follicular microenvironment is fundamental for oocyte growth and acquisition of competence, making the oocyte able to develop and maintain the embryo until the embryonic maternal transition. For this end, the follicular components - granulosa cells, cumulus cells, oocytes and follicular fluid - need to work in unity, since they have a relation of interdependence. Within the mechanisms of communication existing within the follicular environment are vesicles secreted by cells, called extracellular vesicles, which were described in follicular fluid, containing bioactive material such as proteins, lipids and RNAs, including microRNAs. The components of follicular environment may reflect the quality of the oocyte that will be produced and the general hypothesis of this work is that the miRNAs present in the follicular environment regulate signaling pathways important for oocyte development and that the miRNAs and/or messenger RNAs present in the follicular cells can be explored as important tools for the diagnosis of oocyte quality. The first study determined profiles of miRNAs in granulosa cells, cumulus-oocyte complexes and extracellular vesicles derived from these cells and also in follicular fluid. In addition, by knowing the origin and role of miRNAs in the follicular environment, the expression profiles indicated the PI3K-Akt signaling pathway regulation in the follicular environment. In the second study, components of this signaling pathway were then determined in follicular cells associated with oocytes of high or low developmental competence. The results demonstrated that the activation of the PI3K-Akt pathway in follicular cells correlates with increased oocyte competence; conversely, the lower activity of this pathway in follicular cells is related to reduced oocyte competence. In studies three and four, experiments were performed to determine the profile of microRNAs and messenger RNAs in cumulus cells associated with oocytes of high or low developmental competence. Aiming to clarify some of the mechanisms responsible for the best oocyte quality that lead to the identification of oocyte quality biomarkers, allows the advancement and development

of new tools to intensify the *in vitro* production of bovine embryos. Finally, results obtained demonstrate integrated responses between oocytes and follicular cells during follicular development and give new insights to the study of oocyte competence acquisition process and identified oocyte quality markers.

Keywords: Bovine. Cumulus cells. Extracellular vesicles. Follicle environment. *In vitro* embryo production. MiRNAs. Oocyte quality. PI3K-Akt.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Foliculogênese e a comunicação intrafolicular	15
2.2 Desenvolvimento e aquisição de competência oocitária	19
2.3 Vesículas secretadas por células no ambiente folicular	22
2.4 Os microRNAs no desenvolvimento folicular	26
2.5 A via de sinalização PI3K-Akt	30
3 HIPÓTESES	32
3.1 Hipótese do Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”	32
3.2 Hipótese do Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”	32
3.3 Hipótese do Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”	32
3.4 Hipótese do Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> e a qualidade oocitária”	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivos do Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”	33
4.2 Objetivos do Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”	33
4.3 Objetivos do estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”	34
4.4 Objetivos do Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> e a qualidade oocitária”	34
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
5.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”	36
5.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”	36
5.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”	36
5.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> e a qualidade oocitária”	37
6 MATERIAL E MÉTODOS	38
6.1 Informações gerais	38
6.2 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”	38
6.2.1 Dissecção dos folículos e coleta das células	38
6.2.2 Cultivo das células da granulosa e dos complexos cumulus-oócito	38
6.2.3 Coleta do fluido folicular	39
6.2.4 Isolamento das vesículas extracelulares	39
6.2.5 Validação das vesículas extracelulares	40
6.2.5.1 Análise por Nanosight	40
6.2.5.2 Western Blotting	40

6.2.6 Extração do RNA total.....	41
6.2.7 Transcrição reversa e análise dos microRNAs por qPCR em tempo real (RT-qPCR).....	41
6.2.8 Análise estatística.....	42
6.2.9 Análise de bioinformática dos miRNAs de acordo com sua origem.....	42
6.3 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”.....	42
6.3.1 Maturação oocitária, ativação partenogenética e cultivo embrionário individual.....	43
6.3.2 Extração de RNA e proteínas.....	44
6.3.3 Transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) e do microRNA (miRNA).....	44
6.3.4 Análises dos mRNAs e miRNAs por RT-qPCR.....	45
6.3.5 Validação do gene alvo através do ensaio de luciferase.....	46
6.3.6 Detecção da proteína Akt fosforilada por Western Blotting.....	47
6.3.7 Análise estatística.....	48
6.4 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”.....	48
6.4.1 Maturação oocitária, ativação partenogenética e cultivo embrionário individual.....	48
6.4.2 Extração de RNA total e transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA).....	48
6.4.3 Análise do perfil de RNAs por sequenciamento de RNA.....	49
6.4.4 Análise por RT-qPCR dos miRNAs.....	50
6.4.5 Análise estatística.....	50
6.5 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> e a qualidade oocitária”.....	51
6.5.1 Amostras de células do cumulus relacionadas à qualidade oocitária.....	51
6.5.2 Obtenção de células do cumulus após maturação <i>in vivo</i>	51
6.5.3 Análise de transcritos utilizando o sistema de microfluídica.....	52
6.5.4 Análise estatística.....	52
7 RESULTADOS	53
7.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”.....	53
7.1.1 Caracterização das vesículas extracelulares.....	53
7.1.2 O perfil de microRNAs das células foliculares.....	54
7.1.3 O perfil de microRNAs das vesículas extracelulares do meio de cultivo condicionado.....	56
7.1.4 Análise de bioinformática dos microRNAs.....	58
7.1.5 O perfil de microRNAs das vesículas extracelulares do fluido folicular comparado aos outros componentes do ambiente folicular.....	61
7.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”.....	63
7.2.1 Taxas de produção dos embriões partenotos individuais.....	63
7.2.2 Análises dos transcritos PTEN, PI3K e proteína pAkt nas células foliculares relacionadas à qualidade oocitária.....	64
7.2.3 Análise dos miRNAs, miR494 e cluster miR17-92, nas células foliculares relacionadas à qualidade oocitária.....	65

7.2.4 Análises de genes regulados pela via de sinalização PI3K-Akt nas células foliculares relacionadas à qualidade oocitária.....	68
7.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”.....	69
7.3.1 Perfil de mRNAs nas células do cumulus relacionado à competência do oócito ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto.....	69
7.3.2 Análise de miRNAs nas células do cumulus relacionado à competência do oócito ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto.....	72
7.3.3 Relação de expressão entre os microRNAs e RNAs mensageiros alvos.....	76
7.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> e a qualidade oocitária”	77
8 DISCUSSÃO	80
8.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”.....	80
8.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”.....	84
8.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”.....	89
8.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> e a qualidade oocitária”	94
9 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
9.1 Conclusões e considerações finais gerais.....	98
9.2 Conclusões e considerações finais específicas.....	98
9.2.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”.....	98
9.2.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”.....	99
9.2.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”.....	99
9.2.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> e a qualidade oocitária”	100
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICES	120
ANEXO I	151
ANEXO II	161

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões bovinos é uma das biotecnologias da reprodução animal mais empregadas na pecuária nacional. As taxas de gestação de embriões produzidos *in vitro* são variáveis devido à qualidade dos embriões. O atual desafio consiste em buscar métodos ou ferramentas que melhorem os resultados da técnica, em especial, que levem ao aumento na taxa de conversão oócitos a blastocistos (número de embriões produzidos em relação aos oócitos recuperados) e a um aumento da sobrevivência dos embriões após a transferência.

O potencial de desenvolvimento dos embriões depende da qualidade dos oócitos dos quais se originam (LONERGAN et al., 2003; SIRARD et al., 2003). Essa qualidade refere-se à competência oocitária, que é definida como o potencial de um oócito em maturar, ser fecundado, desenvolver até o estágio de blastocisto e consequentemente manter a gestação (SIRARD et al., 2006).

O ambiente folicular ovariano é composto por células somáticas (células da teca, células da granulosa, células do cumulus), lâmina basal, oócito e fluido folicular. A interação entre esses componentes é determinante para garantir a integridade dos processos associados à diferenciação, regulação e produção de um oócito de alta competência (COMBELLES et al., 2010; KRISHER, 2013). Sendo assim, é importante que haja uma comunicação e sincronização de eventos nas células foliculares para que todos os componentes do folículo ovariano funcionem em unidade. No ambiente folicular a comunicação celular é mediada por meio de fatores parácrinos, secretados pelas células ou pelo oócito, por junções comunicantes (junções gap) e por vesículas secretadas pelas células (VEs). Essa constante troca de moléculas pode acontecer diretamente entre as células somáticas ou entre células somáticas e o oócito, mediada por projeções transzonais (TZPs). Evidenciando a dinâmica interação entre os componentes foliculares e sua importância durante todo o desenvolvimento folicular e oocitário.

Independentemente do mecanismo de comunicação, algumas biomoléculas são fundamentais para a troca de informações e a sincronização dos metabolismos. Recentemente, destaca-se o papel dos microRNAs (miRNAs) dentro do ambiente folicular. Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas com funções de regulação pós-transcricional de RNAs mensageiros alvos. Essas moléculas estão presentes no folículo ovariano e regulam vias de sinalização e vias de metabolismo celular importantes durante a foliculogênese e a oogênese e, podem estar associadas à vesículas extracelulares.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo investigar o perfil de miRNAs dos componentes do ambiente folicular e o papel dos mesmos através das vias

celulares por eles reguladas; testar a associação da via de sinalização PI3K-Akt com a qualidade oocitária e, por fim, compreender as diferenças de níveis de expressão de miRNAs e RNAs mensageiros nas células do cumulus que estão relacionadas à competência dos oócitos em desenvolver-se até o estágio de blastocisto.

Este trabalho foi dividido em quatro estudos. No primeiro deles, intitulado “A origem e o papel dos miRNAs presentes nas células e nas vesículas extracelulares assim como no microambiente do folículo ovariano bovino” foram analisados os miRNAs presentes em células da granulosa, complexos cumulus-oócito e nas vesículas extracelulares secretadas por ambos tipos celulares em cultivo bem como o perfil de miRNAs obtidos das vesículas extracelulares presentes no fluido folicular. Os resultados deste estudo estão relatados em um artigo que foi publicado em junho de 2017 no periódico *Reproduction in Domestic Animals* intitulado *Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle* (ANDRADE et al., 2017a) (Anexo I).

Ainda no estudo 1 observou-se a regulação da via de sinalização PI3K-Akt pelos miRNAs de forma significativa e com alto número de genes envolvidos nos diferentes compartimentos do ambiente folicular. Dessa forma, no estudo 2, intitulado “A via de sinalização PI3K-Akt associada à competência oocitária em bovinos” avaliou-se a correlação de alguns componentes dessa via e alguns genes com funções celulares distintas reguladas por essa via de sinalização em células foliculares de folículos que originaram oócitos com diferentes níveis de capacidade ao desenvolvimento. Estes resultados do estudo 2 geraram um artigo, intitulado “*The Role of the PI3K-Akt Signaling Pathway in the Developmental Competence of Bovine Oocytes*”, que foi publicado no periódico *PLoS One* (ANDRADE et al., 2017b) em setembro de 2017 (Anexo II).

No estudo 3, intitulado “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos” foram comparados os perfis de miRNAs e de mRNAs de células do cumulus associadas a oócitos mais competentes, que se desenvolveram até o estágio de blastocisto, com células do cumulus de oócitos menos competentes, que pararam seu desenvolvimento em fases anteriores. Por fim, no estudo 4, “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”, células do cumulus de oócitos maturados *in vivo* foram comparadas, quanto à expressão de alguns mRNAs, com células do cumulus após maturação *in vitro* de acordo com o modelo de competência de desenvolvimento do oócito até o estágio de blastocisto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Foliculogênese e a comunicação intrafolicular

Os ovários tem duas funções principais na reprodução, o desenvolvimento dos oócitos e a produção de hormônios reprodutivos. Eles são órgãos dinâmicos e sua unidade estrutural e funcional são os folículos. A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação dos folículos (COMBELLES et al., 2010) e a oogênese o processo de crescimento, capacitação e maturação do oócito (HENNET; COMBELLES, 2012). O ovário possui uma reserva em forma de folículos primordiais, os quais são periodicamente recrutados e se desenvolvem em folículos primários, secundários e antrais.

Durante a foliculogênese, o folículo se desenvolve desde o estágio de folículo primordial, que é composto de um oócito quiescente e envolto por uma camada de células da granulosa pavimentosa (FAIR et al., 1997) até o estágio de folículo pré-ovulatório que é um folículo formado por diferentes tipos celulares; células da teca, células da granulosa, células do cumulus e o oócito; e por um antro preenchido por fluido folicular. O desenvolvimento folicular e a maturação oocitária estão fortemente associados (Di PIETRO, 2016) e esses eventos são controlados pelas próprias células foliculares somáticas e pelo oócito (MERMILLOD et al., 2008), sendo a produção de um oócito competente uma consequência da sinalização e comunicação coordenada entre as diferentes células presentes no ambiente folicular (KRISHER, 2013).

Existe uma intensa comunicação entre as células foliculares e entre as células foliculares e o oócito desde o início do desenvolvimento folicular (CLARKE, 2017). A comunicação celular no ambiente folicular já foi descrita através da secreção de fatores parácrinos, através das junções comunicantes e, mais recentemente pelas vesículas secretadas por células (vesículas extracelulares). Sendo, a comunicação entre as células foliculares e o oócito após a formação da zona pelúcida mediada por projeções transzonais (TZPs).

Uma das primeiras formas de comunicação descritas no ambiente folicular foi a comunicação através dos fatores parácrinos que é caracterizada pela troca de substâncias sinalizadoras e nutrientes entre as células (ELFOULY et al., 1970; NEKOLA; NALBANDO, 1971). Depois, mecanismos citoplasmáticos de trocas foram descritos por meio de junções comunicantes, responsáveis pela troca de pequenas moléculas (até 1 KDa) entre o oócito e células do cumulus e também células somáticas entre si (KIDDER; VANDERHYDEN, 2010). Posteriormente a

comunicação através do envio de grandes moléculas através das vesículas extracelulares contendo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (DA SILVEIRA et al., 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Figura simplificada dos mecanismos de comunicação mais descritos dentro do ambiente folicular.

Comunicação intrafolicular

Fonte: Própria autoria.

A comunicação através dos fatores parácrinos que é caracterizada principalmente pelos fatores secretados pelo oócitos (OSFs), como o GDF9 e BMP15 (HUSSEIN et al., 2006), também está relacionada a fatores secretados pelas células foliculares como, por exemplo, lactato, piruvato e fosfocreatina (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010; SCANTLAND et al., 2014). Entre as principais funções dos OSFs estão o crescimento folicular, proliferação celular, apoptose, regulação da esteroidogênese e da luteinização, expansão e metabolismo das células do cumulus (THOMPSON et al., 2013).

Além do GDF9 e do BMP15, outros fatores secretados pelos oócitos estudados são fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) que são considerados importantes, mas quando comparados aos membros da família TGF- β , não foram muito investigados. Porém, já foram descritos como reguladores do desenvolvimento de células da granulosa e também atuando em conjunto com as proteínas da família TGF- β (EMORI; SUGIURA, 2014). Em bovinos, já foi identificado o FGF2 em oócitos de folículo primordial e primário (VANWEZEL et al., 1995), o FGF8, o FGF10 e o FGF17 (BURATINI et al., 2005; BURATINI Junior et al., 2007; MACHADO et al., 2009), alguns deles com funções ainda não esclarecidas.

A sinalização parácrina é fundamental para a função pré-antral das células da granulosa e do cumulus, assim como para o estabelecimento e manutenção da função das células do cumulus no folículo antral (GILCHRIST et al., 2008). O bloqueio dessa sinalização oocitária, quer por remoção física do oócito (EPPIG et al., 1997; LI et al., 2000) ou por remoção da sinalização de proteínas sinalizadoras intracelulares (SMADs) (GILCHRIST et al., 2006; DRAGOVIC et al., 2007), faz com que as células do cumulus percam o seu fenótipo e adquiram características de células da granulosa mural.

Além da sinalização parácrina, as células foliculares e o oócito também se comunicam de forma direta por canais intracelulares formados por proteínas transmembrânicas denominados junções comunicantes ou junções gap (EVANS, 2015). Grande parte da interação entre as células foliculares e entre as células do cumulus e o oócito acontece através das junções gap, sendo estas consideradas a principal forma de ligação entre as células do cumulus e o oócito (SANTIQUET et al., 2012; FENG et al., 2013).

As junções gap são formadas por proteínas transmembrânicas chamadas conexinas (Cx) (WEBER et al., 2010) e permitem a troca de moléculas de baixo peso molecular como íons, para regular o pH do oócito, metabólitos e nutrientes (incluindo aminoácidos e glicose) para suportar o metabolismo oocitário (SANTIQUET et al., 2012; WIGGLESWORTH et al., 2013). As conexinas Cx43 e Cx45 são mais associadas às ligações entre células da granulosa e as Cx37 e Cx43 mais envolvidas com a comunicação entre as células do cumulus e o oócito (ZUCCOTTI et al., 2011).

As junções gap são consideradas fundamentais para o crescimento e maturação do oócito, assim como para a fertilização. Além das funções já descritas, as junções comunicantes transferem nucleotídeos cíclicos para o oócito, os quais são fundamentais para a regulação da meiose (LI et al., 2012), como por exemplo o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), os quais estão relacionados tanto com a inibição da retomada da meiose espontânea da vesícula germinativa, quanto permitindo a retomada da meiose após o sinal ovulatório, ativação do fator promotor da meiose (CONTI et al., 2012).

O transporte de grandes moléculas no ambiente folicular é possível através de vesículas secretadas por células (vesículas extracelulares - VEs), já identificadas no líquido folicular de equinos (DA SILVEIRA et al., 2012), bovinos (SOHEL et al., 2013; ANDRADE et al., 2017a), humanos (SANG et al., 2013) e em meio de cultivo proveniente do cultivo in vitro de células foliculares (ANDRADE et al., 2017a). Essas VEs transportam moléculas bioativas como proteínas, miRNAs e mRNAs, os quais

ficam protegidos, no ambiente extracelular, por causa da presença da bicamada lipídica (TAYLOR; GERCEL-TAYLOR, 2014).

Devido à sua capacidade de serem captadas por células da granulosa *in vitro* e *in vivo* (DA SILVEIRA et al., 2012; SOHEL et al., 2013), as VEs e seu conteúdo participam de forma importante na comunicação entre as células foliculares e o oócito durante o desenvolvimento folicular. As vesículas extracelulares, são classificadas em microvesículas e exossomos de acordo com características como tamanho, origem, formas de liberação, composição de lipídeos e proteínas de membranas. O conteúdo das VEs depende da célula de origem e pode mudar de acordo com mudanças fisiológicas deste tecido (AKERS et al., 2013; HANNAFON; DING, 2013). Já foi demonstrada a participação das vesículas secretadas por células em vários processos fisiológicos e patológicos (GYORGY et al., 2011) com grande potencial diagnóstico e possivelmente terapêutico.

Um importante canal de comunicação entre as células que formam a corona radiata e o oócito são as projeções transzonais (TZPs), que semelhantes a outras formas de projeções celulares permitem a comunicação entre duas células que não estão justapostas. As TZPs são canais de comunicação, sem a fusão de membranas plasmáticas, de aproximadamente 2µm de diâmetro, formadas por filamentos de actina ou tubulina que estão presentes em abundância na zona pelúcida dos oócitos. A comunicação via TZPs é mais intensa nas primeiras 9 horas de maturação e diminui, quase completamente, até as 22 horas de maturação (MACAULAY et al., 2014). Devido ao diâmetro dessas estruturas, elas permitem o transporte de grandes moléculas e até pequenas organelas (MACAULAY et al., 2014) das células do cumulus para o oócito como, por exemplo, RNAs mensageiros, permitindo que as células do cumulus contribuam para a formação da reserva de transcritos maternos no oócito, mesmo quando este já está transcricionalmente inativo (MACAULAY et al., 2016) e também transporte de lipídios através de proteínas carreadoras, mais especificamente pela FAPB3 (DEL COLLADO et al., 2017).

Seja através de fatores parácrinos, de junções comunicantes e/ou vesículas secretadas por células, pelas TZPs ou diretamente, as células do ambiente folicular estão em sincronia, funcionando em unidade, desde a etapa de folículos primordiais, durante toda a foliculogênese até o momento da ovulação. Como um processo dinâmico, em cada fase do desenvolvimento os diferentes tipos de comunicação tem participações diferentes e fundamentais. Alterações nessas interações celulares podem prejudicar o oócito e posteriormente a gestação (ASSOU et al., 2013).

2.2 Desenvolvimento e aquisição de competência oocitária

Os oócitos são formados durante a vida fetal do indivíduo, a partir das células germinativas primordiais (PGCs) que, de forma resumida, migram inicialmente para o saco vitelínico e posteriormente para as cristas genitais (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Após a colonização das gônadas pelas PGCs estas se diferenciam em oogônias, nas fêmeas, devido ao cromossomo sexual presente, e entram em intensa proliferação mitótica e alta atividade transcricional (PICTON et al., 1998). No ovário em desenvolvimento, essas oogônias vão se organizando com células somáticas, pré-granulosas e, durante essa formação dos folículos, as células germinativas param de fazer mitose e passam a fazer meiose, se transformando em oócitos primários (GUIGON; MAGRE, 2006).

Ainda na fase fetal, esses oócitos atingem a fase de prófase I da primeira divisão meiótica e ficam paradas no estágio de diplóteno, conhecido como estágio de vesícula germinativa (VG). O oócito em fase de VG associado a uma camada de células da granulosa pavimentosa formam as estruturas chamadas folículos primordiais, que compõem a reserva folicular ovariana. Após o nascimento da fêmea, retomam de forma lenta e coordenada seu crescimento, capacitação e maturação, etapas fundamentais para o processo de aquisição de competência oocitária, que só terminam após a puberdade; e a divisão meiótica, por sua vez, só é concluída após a fecundação (PICTON, 2001).

A competência oocitária é definida como a habilidade ou potencial de um oócito maturar-se, ser fecundado, desenvolver-se até o estágio de blastocisto e manter o desenvolvimento embrionário até a gestação chegar a termo (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Sabe-se que os oócitos adquirem competência gradualmente ao longo do desenvolvimento folicular (EPPIG et al., 1992; MERMILLOD et al., 2008; HENNET; COMBELLES, 2012), entretanto, os mecanismos envolvidos na aquisição de competência oocitária não foram completamente elucidados. Vários fatores influenciam na aquisição de competência oocitária, incluindo fatores externos à fêmea como a idade, a nutrição e o estresse (MOUSSA et al., 2015); assim como fatores internos, como estimulação hormonal do folículo (SIRARD et al., 2006), tamanho do folículo (LONERGAN et al., 1994), saúde do folículo (BLONDIN; SIRARD, 1995), comunicação intercelular (KRISHER, 2004; SUGIMURA et al., 2017), fatores secretados pelo próprio oócito (HUSSEIN et al., 2006) e composição do líquido folicular (KRISHER, 2013), entre outros.

Alguns fatores intrínsecos ao oócito também são importantes para o processo de aquisição de competência. É necessário que ele acumule, durante o seu

crescimento, reservas de mRNAs, ribossomos e proteínas para concluir seu crescimento e suportar o desenvolvimento embrionário até a transição materno embrionária (MERMILLOD; MARCHAL, 1999). Em mamíferos, foi descrita uma relação positiva do tamanho do oócito (FAIR et al., 1995; MIYANO; MANABE, 2007) e também da quantidade e qualidade das moléculas armazenadas (SIRARD et al., 2006) com a qualidade oocitária. Curiosamente, para o sucesso da ativação do genoma embrionário e do desenvolvimento de competência oocitária o ambiente folicular tem papel de induzir e sinalizar para o oócito produzir/armazenar corretamente esses estoques moleculares (SIRARD et al., 2006).

A competência oocitária depende do sucesso de uma série de eventos, dentre eles a maturação nuclear (com a retomada da meiose) e citoplasmática (com alterações moleculares e estruturais) (BEVERS et al., 1997) e reconhecidamente os processos de maturação têm efeito importante sobre a aquisição de competência oocitária, pois sem a adequada maturação do oócito não há o desenvolvimento embrionário. Diferentemente da maturação *in vivo*, na maturação *in vitro* o oócito, frequentemente tem seu metabolismo alterado e um potencial de desenvolvimento reduzido (HENNET; COMBELLES, 2012). Tal efeito pode ser consequência da diferença entre a disponibilidade de nutrientes e de enzimas presentes no ambiente folicular daqueles fornecidos no meio de maturação (KRISHER, 2004). Como no folículo ovariano as células somáticas e o oócito estão em intensa comunicação (KRISHER, 2013) provavelmente esse potencial de desenvolvimento reduzido é devido à inabilidade em reproduzir *in vitro* a dinâmica existente no ambiente *in vivo*.

Dentro do ambiente folicular cada tipo celular é responsável por suprir alguns requisitos para a adequada maturação e a aquisição de competência oocitária (HENNET; COMBELLES, 2012). Essas interações coordenadas entre as células somáticas e o oócito tentam equilibrar o metabolismo celular com as necessidades energéticas na foliculogênese, incluindo, por exemplo, a mudança de utilização de energia durante o reinício a meiose (DUMESIC et al., 2015). Quando esses mecanismos celulares são perturbados por alterações metabólicas e/ou envelhecimento materno, danos moleculares no oócito podem alterar macromoléculas, induzir mutações mitocondriais e reduzir a produção de trifosfato de adenosina (DUMESIC et al., 2015). Ou seja, defeitos nas interações entre as células do cumulus e o oócito podem afetar a qualidade oocitária e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário e a manutenção da gestação (ASSOU et al., 2013).

O diagnóstico da competência oocitária é uma alternativa para melhorar o desempenho das tecnologias de reprodução assistida tanto em humanos quanto nos

demais animais. Muitos estudos propõem-se a identificar novos biomarcadores de qualidade oocitária que sejam não invasivos, acessíveis e com alta repetibilidade. Através da literatura disponível, fica evidente que a aquisição de competência oocitária é um processo multifatorial e cumulativo, o que torna difícil prever a capacidade oocitária ao desenvolvimento (SIRARD; ASSIDI, 2013). Os critérios usados, na rotina, para avaliar a qualidade dos oócitos de mamíferos são, em sua maioria, morfológicos, como homogeneidade do citoplasma, forma do corpúsculo polar, espessura da zona pelúcida e quantidade de camadas de células do cumulus. Entretanto, em humanos, concluiu-se que a combinação desses fatores não foi eficiente para prever os resultados da fertilização *in vitro* (RIENZI et al., 2011).

Como já foi explicado, o microambiente folicular é fundamental para o completo desenvolvimento oocitário e sua composição reflete o status fisiológico do folículo. O folículo de origem é considerado o principal determinante para a qualidade dos oócitos (BLONDIN et al., 2012). Portanto, os componentes desse ambiente, células e fluido folicular, podem fornecer informações úteis sobre a qualidade oocitária. A busca de biomarcadores nas células foliculares - células do cumulus, células da granulosa e/ou células da teca - tem sido uma das estratégias mais utilizadas para identificar diferenças entre oócitos de alta e baixa qualidade (CILLO et al., 2007; ASSOUL et al., 2008; FEUERSTEIN et al., 2012; BERGANDI et al., 2014; LABRECQUE; SIRARD, 2014; MATOBA et al., 2014; PARKS et al., 2016; MELO et al., 2017).

A espécie bovina é a mais utilizada para esse tipo de estudo e alguns dos critérios usados para avaliar a qualidade dos oócitos são tamanho do folículo, tipo de cultivo (*in vivo*, *in vitro*), idade materna, cinética de desenvolvimento, coloração de BCB (*brilliant cresyl blue*), estimulação ovariana, crescimento oocitário, síndrome do ovário policístico, configuração da cromatina e as técnicas utilizadas variam desde PCR quantitativo de genes candidatos a buscas mais amplas por transcriptômica (sequenciamento de RNAs totais) (LABRECQUE; SIRARD, 2014). Não existe, porém, uma lista definitiva de genes úteis como biomarcadores de competência oocitária, talvez porque a competência esteja associada a atividade de vias funcionais, representadas por conjuntos de genes, proteínas, miRNAs e demais elementos regulatórios.

No líquido folicular algumas moléculas têm sido estudadas como marcadores de qualidade. A melhoria da qualidade dos oócitos tem sido associada com níveis aumentados de fatores estimulantes de colônias de granulócitos (G-CSF) (LEDEE et al., 2013), interleucinas (SARAPIK et al., 2012); fator neurotrópico derivado do cérebro (BDNF) (WU et al., 2012); e proteína morfogénica do osso 2 (BMP-2)

(SUGIYAMA et al., 2010), bem como uma diminuição dos níveis de IL-1 e IL-12 (MENDOZA et al., 2002). Além disso, anfirregulina (LIU et al., 2012) e GDF-9 (GODE et al., 2011), também têm sido positivamente correlacionados com a qualidade dos oócitos.

Em estudos de proteômica do fluido folicular, proteínas do metabolismo, de remodelação da matriz extracelular e respostas imunes (TWIGT et al., 2012; AMBEKAR et al., 2013; BIANCHI et al., 2013) também têm sido associadas à competência. Análises de metabolômica do FF mostraram maiores concentrações de L-alanina, glicina e L-glutamato e menores de uréia no fluido folicular de folículos associados a oócitos que se desenvolveram até o estágio de blastocisto quando comparados com oócitos que degeneraram durante o processo (MATOBA et al., 2014). Da mesma forma, os ácidos graxos no líquido folicular também foram associadas à melhor qualidade oocitária, como por exemplo menor quantidade de ácido palmítico, menor concentração de ácidos graxos totais e uma maior concentração de ácido linolênico (O'GORMAN et al., 2013; MATOBA et al., 2014).

Ao longo da última década, o papel dos miRNAs surgiu de forma importante e diferentes estudos tentaram associar perfis de expressão de miRNAs específicos à qualidade de oócitos, em células de granulosa, em células do cumulus e no líquido folicular (LI et al., 2015; MCGINNIS et al., 2015) e também em vesículas secretadas por essas células no fluido folicular (SOHEL et al., 2013), os quais serão discutidas a seguir.

2.3 Vesículas secretadas por células no ambiente folicular

As vesículas secretadas por células, também conhecidas como vesículas extracelulares (VEs), foram descobertas há cerca de 30 anos (JOHNSTONE et al., 1987), mas devido às barreiras tecnológicas elas foram descritas como “pequenas sacolas de lixo” (MATHIVANAN et al., 2010; VLASSOV et al., 2012). Com o avanço das metodologias e tecnologias de estudo foram associados à resposta imune e mais recentemente denominadas como um novo mecanismo de comunicação celular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

As VEs são vesículas que podem ser liberadas por diversos tipos celulares e têm como característica geral possuírem bicamada fosfolipídica (SIMPSON; MATHIVANAN, 2012). As EVs são classificadas em microvesículas (MVs) e exossomos (Exos) de acordo com características como tamanho, formato, proteínas de membrana, lipídios estruturais e origem. As MVs são maiores, com diâmetro variando entre 500-1000nm, possuem formato irregular e se originam do

rompimento de um pedaço da membrana plasmática da célula. Os Exos possuem diâmetro aproximado de 50-100 nm (CRESCITELLI et al., 2013) e dependendo da preparação aparecem em microscopia eletrônica em um formato de taça; têm origem dos endossomos tardios, também chamados corpos multi-vesiculares e são liberados para o espaço extracelular por fusão da membrana do corpo multi-vesicular com a membrana plasmática da célula (TAYLOR; GERCEL-TAYLOR, 2014). Essas vesículas extracelulares transportam, principalmente, proteínas, miRNAs, RNAs mensageiros e lipídios (TAYLOR; GERCEL-TAYLOR, 2014).

O conteúdo genético e proteico das vesículas extracelulares é um reflexo do conteúdo da célula de origem (AKERS et al., 2013) e pode variar de acordo com mudanças fisiológicas deste tecido (HANNAFON; DING, 2013). Geralmente as MVs possuem proteínas de membrana plasmática como a anexinV, proteínas intracelulares, mRNAs e miRNAs. Os Exos são caracterizados por possuírem proteínas da família das tetraspans como CD63, CD9 e CD81 (GYORGY et al., 2011). Ambos os tipos vesiculares desenvolvem funções semelhantes, entre as principais funções das microvesículas estão atividade coagulante, atividade invasiva de tumores, indução de características oncogênicas nas células e comunicação materno-fetal (GYORGY et al., 2011; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As principais funções dos exossomos são apresentação de antígeno, resposta imune anti-tumoral, interação espermatozoide-oócito e comunicação materno-fetal (GYORGY et al., 2011; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

A maneira de interação das vesículas e sua função no tecido alvo estão intimamente relacionadas ao tipo celular de origem. Essas vesículas já foram descritas em diversos fluidos corporais, tais como saliva (OGAWA et al., 2011), fluido amniótico (ASEA et al., 2008), soro sanguíneo (CABY et al., 2005), sêmen (AALBERTS et al., 2012), bile (MASYUK et al., 2010) e o fluido folicular (DA SILVEIRA et al., 2012). A presença dessas VEs em diferentes fluidos corporais faz com que sejam propostas como novos possíveis marcadores para o diagnóstico de doenças, como pré-eclâmpsia, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de ovário, doenças cardíacas, tumores cerebrais e outras diversas patologias (PANT et al., 2012).

Aproximadamente 92.897 proteínas, 584 lipídios, 27.642 mRNAs e 4.934 miRNAs, em 33 espécies, já foram identificados em vesículas extracelulares (KALRA et al., 2012), esse conteúdo de macromoléculas pode influenciar diferentes processos fisiológicos e patológicos modificando o fenótipo tanto das células secretoras como das células alvo (LO CICERO et al., 2015; YANEZ-MO et al., 2015). Os exossomos representam o tipo de VEs mais estudado pois, são

provenientes de um mecanismo mais controlado de liberação e acredita-se que seu conteúdo é mais selecionado, já os outros tipos vesiculares são originados em razão de morte celular e/ou liberados em momentos de estresse. Devido à sua capacidade de transporte de biomoléculas e à possibilidade de entregar essas moléculas - ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas - para outras células, os exossomos despertaram a curiosidade de vários grupos de pesquisa devido ao potencial biológico, diagnóstico e terapêutico (SAADELDIN et al., 2015).

Existem três mecanismos de interação entre os exossomos e suas células alvo. O primeiro deles por interação direta entre proteínas de membrana dos exossomos com receptores na membrana da célula alvo; o segundo por clivagem da membrana dos exossomos por proteases presentes no espaço extracelular e os produtos liberados atuam nos receptores da célula alvo; e o terceiro por fusão direta das membranas do exossomo com a membrana celular, liberando o conteúdo exossomal no interior da célula e incorporando proteínas e receptores exossomais na membrana celular (MATHIVANAN et al., 2010).

A gametogênese, a fertilização, a implantação embrionária e desenvolvimento inicial do embrião são processo complexos que são altamente dependentes da comunicação entre células e órgãos, por isso, na reprodução os exossomos já foram descritos, como importantes, no ambiente folicular (HUNG et al., 2015; MACHTINGER et al., 2016) (Figura 2) e também nas interações materno-fetais no período pré e pós-implantação ao longo da gestação (BURNETT; NOWAK, 2015; SAADELDIN et al., 2015).

Figura 2 - Vesículas extracelulares (VEs) no ambiente folicular.

Fonte: Adaptada de MACHTINGER, R.; LAURENT, L. C.; BACCARELLI, A. A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 2, p. 182-193, Mar-Apr 2016.

Na produção *in vitro* de embriões bovinos, exossomos do fluido folicular foram capazes de alterar as taxas de embriões produzidos assim como causar alterações nos níveis de expressão de genes relacionados ao metabolismo e ao desenvolvimento embrionário (DA SILVEIRA et al., 2017). Foi também demonstrado que os embriões blastocistos secretam exossomos e as características dessas VEs variam de acordo com a qualidade e o tipo desses embriões (MELLISHO et al., 2017). Em suínos, embriões clones quando cocultivados com embriões partenotos (PA), internalizaram exossomos proveniente dos embriões PA e tiveram maior taxa de clivagem e maior taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, demonstrando a sinalização parácrina entre os embriões (SAADELDIN et al., 2014). Em outro trabalho, embriões que tiveram o meio de cultivo renovado ao longo do cultivo *in vitro* tiveram seu desenvolvimento prejudicado, em quantidade e qualidade, quando comparados aqueles em que o meio foi mantido durante todo o cultivo e ainda, que esse efeito foi revertido quando era adicionado ao meio novo exossomos de outros embriões (QU et al., 2017).

Os folículos ovarianos são um excelente ambiente para o estudo dos exossomos por ser um ambiente mais restrito e limitado permitindo conhecer a origem, as células alvo, sua função e seu conteúdo. Possibilitando, também entender melhor o complexo processo que regula a maturação e o crescimento folicular assim como a produção de um oócito de qualidade (DI PIETRO, 2016). No ambiente folicular, foi demonstrado que os exossomos têm a capacidade de serem internalizados por células da granulosa (DA SILVEIRA et al., 2012) comprovando assim, participação dessas vesículas extracelulares na comunicação intrafolicular (DA SILVEIRA et al., 2012; SOHEL et al., 2013) e possibilitando a transferência de macromoléculas como miRNAs, lncRNAs, proteínas, lipídios entre células foliculares através dos exossomos pelo líquido folicular (DI PIETRO, 2016). Vesículas de folículos durante diferentes etapas do desenvolvimento influenciaram de forma diferente a expansão das células do cumulus e também a expressão gênica do COC (HUNG et al., 2015), provavelmente, pelo fato do fluido folicular proveniente de folículos de diferentes diâmetros possuírem VEs de tamanhos semelhantes, mas em quantidade e com conteúdos diferentes (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016).

Embora existam muitas pesquisas na área, o conhecimento sobre a comunicação intracelular mediada pelos exossomos e/ou microvesículas dentro do ambiente folicular ainda é limitado. Sabe-se que o FF possui vesículas extracelulares secretadas pelo oócito e pelas células somáticas e que existe uma relação entre a composição do fluido folicular com a qualidade oocitária (DI PIETRO,

2016). Assim sendo, faz-se necessário uma melhor caracterização do conteúdo exossomal dentro do líquido folicular, para esclarecer informações como origem dos exossomos, células alvos, dinâmica durante o desenvolvimento folicular, efeitos; e para explorar melhor o potencial como biomarcadores de qualidade oocitária, no diagnóstico de doenças reprodutivas ou em respostas a tratamentos hormonais.

2.4 Os microRNAs no desenvolvimento folicular

Os miRNAs estão envolvidos na regulação de genes e, consequentemente, no desenvolvimento e na diferenciação de diversos tipos celulares, de importantes processos fisiológicos e patológicos (KROPP et al., 2014). Em mamíferos, é predito que os miRNAs controlam a atividade de mais de 60% de todos os genes que codificam proteínas (FRIEDMAN et al., 2009). Na função ovariana, eles contribuem na diferenciação de células germinativas, além do crescimento, desenvolvimento e maturação de folículos e oócitos (HOSSAIN et al., 2012).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA, de fita simples, que possuem, em média 18-25 nucleotídeos. Essas moléculas são incapazes de codificar proteínas, mas regulam a tradução dos RNAs mensageiros. Possuem funções no silenciamento da expressão de mRNAs específicos (KROL et al., 2010), sendo que um único miRNA pode ter diversos genes como alvo e também um único gene pode ser alvo de vários miRNAs (ARAVIN; TUSCHL, 2005; ZIELAK-STECIWKO et al., 2014). Normalmente se ligam na região 3'UTR dos mRNAs alvos e dependendo do tipo de pareamento, perfeito ou imperfeito, direcionam esses mRNAs para degradação ou inibem sua tradução, respectivamente (CORTEZ; CALIN, 2009). Nas células animais, as ligações mais frequentemente estudadas são por interações imperfeitas dos pares de bases entre a região 3'UTR dos RNAs alvos e a 5' proximal da região "seed", entre as posições 2 e 8, do miRNA levando à inibição da tradução (FABIAN et al., 2010).

Os miRNAs são originados da transcrição endógena. Os miRNAs primários (pri-miRNAs) possuem estruturas semelhantes a grampos de cabelo (*hairpin*) e são transcritos através da ação da enzima RNA polimerase II. Ainda dentro do núcleo celular, os pri-miRNAs são clivados pela Drosha, uma enzima RNase (FAZI; NERVI, 2008; RACZ et al., 2011; GROSS et al., 2017). Depois de clivados os miRNAs são denominados miRNAs precursores (pre-miRNAs), que são reconhecidos por uma proteína nuclear chamada Exportin-5 que os deslocam para o citoplasma celular (LUND et al., 2004). No citoplasma as fitas duplas de RNA são clivadas pela ação da enzima Dicer, uma enzima RNase III (HUTVAGNER et al., 2001) e após a

clivagem da dupla fita, a fita anti-senso permanece associada ao complexo de indução ao silenciamento do RNA (RISC) guiando esse complexo ribonucleico ao mRNA alvo, enquanto a fita senso é degradada (RACZ et al., 2011) (Figura 3). No genoma, os miRNAs podem estar presentes em grupos ou serem transcritos individualmente, localizam-se em sequências de introns, exons ou mesmo em regiões intergênicas. MiRNAs intrônicos na mesma direção dos genes circundantes são geralmente transcritos junto com os genes hospedeiros, e separados pela maquinaria de *splicing* do transcrito maior no qual está inserido (FAZI; NERVI, 2008).

Figura 3 - Figura ilustrativa da via de biogênese dos miRNAs.

Fonte: Adaptada de GROSS, N.; KROPP, J.; KHATIB, H. MicroRNA Signaling in Embryo Development. **Biology**, v. 6, n. 3, p. 34, 2017.

A primeira evidência da importância dos miRNAs na função ovariana foi através do *knockout* da enzima Dicer que resultou em problemas durante a foliculogênese e na infertilidade das fêmeas (MURCHISON et al., 2007; NAGARAJA et al., 2008; LEI et al., 2010; YUAN et al., 2014). Desde então, a função dos miRNAs na função ovariana e no desenvolvimento folicular tem sido descrita por vários autores (TRIPURANI et al., 2010; DONADEU et al., 2012; GROSS et al., 2017), mas a presença, abundância e a expressão desses miRNAs durante cada etapa desse processo precisa ser melhor compreendida (SALILEW-WONDIM et al., 2014; SONTAKKE et al., 2014).

Acredita-se que a maioria dos miRNAs desempenham papéis importantes em uma variedade de atividades celulares e fisiológicas, tais como maturação oocitária, apoptose, foliculogênese, proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento do embrião e a formação da placenta (BUENO et al., 2008; SUH et al., 2010; ASSOUE et al., 2013; KIM et al., 2013; HOSSAIN et al., 2014; ZIELAK-STECIWKO et al., 2014). No ambiente folicular esses miRNAs podem estar nas células somáticas, no oócito,

ou no fluido folicular sob a forma livre ou presentes dentro das vesículas extracelulares participando da comunicação celular.

Em ratas e em vacas, a análise dos miRNAs durante a oogênese demonstrou que uma grande quantidade de genes maternos são regulados por eles (LINGENFELTER et al., 2011); em humanos, após um estudo do perfil dos miRNAs das células do cumulus e do oócito em MII constatou-se que a comunicação entre esses dois tipos celulares é, provavelmente, influenciada por miRNAs (ASSOU et al., 2013); e em ovinos, utilizando células da granulosa demonstrou-se que a dinâmica da expressão de miRNAs se altera durante o crescimento folicular (MCBRIDE et al., 2012). Salilew-Wondim e colaboradores (2014) identificaram 108 miRNAs diferencialmente expressos entre células da granulosa de folículos subordinados e dominantes. Análises de bioinformática dos genes preditos de serem regulados por esses miRNAs mostraram que a maior parte desses miRNAs alterados estão relacionados as vias de sinalização Wnt, sinalização TGF-beta, meiose oocitária e sinalização GnRH. Resultado semelhante foi encontrado por Zielak-Steciwko e colaboradores (2014) que também identificaram miRNAs regulando importantes vias de sinalização e vias relacionadas à meiose oocitária em células da teca e células da granulosa de bovinos, e alguns desses miRNAs foram expressos diferencialmente entre folículos dominantes e subordinados. Portanto, a expressão dos miRNAs nas células da granulosa pode ser associada a recrutamento, seleção e dominância folicular.

Comparando células da granulosa murais de folículos desenvolvidos e saudáveis com folículos pequenos, Sontakke e colaboradores (2014) identificaram que os miRNAs bta-miR-144, bta-miR-202, bta-miR-451, bta-miR-652 e bta-miR-873 estavam em maiores níveis em folículos saudáveis e participam de vias envolvidas na proliferação de células foliculares, esteroidogênese, prevenção de luteinização prematura e controle da maturação oocitária. Os miRNAs também podem variar dentro do ambiente folicular de acordo com a idade das fêmeas, como já observado em éguas. Três miRNAs, miR-181a, miR-375 e o miR-513a-3p, estavam mais expressos em exossomos de éguas mais idosas. Esses miRNAs participam da regulação de genes da via TGF-beta, que é importante para o crescimento e desenvolvimento folicular; essa via menos ativa em éguas idosas poderia justificar, parcialmente, a menor fertilidade dessas fêmeas (DA SILVEIRA et al., 2012).

Vários estudos mostram que o perfil dos miRNAs se altera ao longo do ciclo reprodutivo de acordo com o estímulo hormonal. O tratamento de células da granulosa de camundongos com o hormônio FSH alterou a expressão de 31

miRNAs (YAO et al., 2010). De forma similar, foi observada a influência dos andrógenos sob a expressão do miR-125b e vários experimentos demonstraram que este miRNA diminui a tradução de proteínas pró apoptóticas em células da granulosa, promovendo a sobrevivência folicular (SEN et al., 2014). Em camundongos, análises de arranjos de miRNAs identificaram a presença de 13 miRNAs diferencialmente expressos nas células da granulosa antes e após doses ovulatórias de hCG (FIEDLER et al., 2008).

A expressão dos miRNAs nas células da granulosa é mais estudada e sua importância no processo de desenvolvimento folicular é um pouco mais conhecida. A função e os genes alvos preditos de alguns miRNAs tem sido descrita como, por exemplo, em suínos o miR-378 (XU et al., 2011), em camundongos o miR-21 (CARLETTI et al., 2010), miR-320, miR-383 (YIN et al., 2014), miR-224 (YAO et al., 2010) e o miR-145 (YAN et al., 2012; YANG et al., 2013) e em ovelhas, o miR-17-5p e o let-7b (OTSUKA et al., 2008).

Embora a deleção específica das enzimas DGCR8 e DROSHA em oócitos durante a maturação revele que o papel dos miRNAs nos oócitos é limitado, sendo os miRNAs mais importantes nas células foliculares somáticas durante o desenvolvimento folicular (SUH et al., 2010; YUAN et al., 2014), os miRNAs também estão presentes e com funções fundamentais nas células do cumulus e nos oócitos (DA SILVEIRA et al., 2012). Contudo, o papel dos miRNAs nos oócitos não está esclarecido. Análises de complexos cumulus-oócito de bovinos demonstraram a presença de 64 agrupamentos de miRNAs e todos os genes de processamento (*XPO5*, *DICER*, *DGCR8*, *TARBP2*, *RNASEN* e *EIF2C2*) estavam em maior nível de expressão nos oócitos quando comparados aos COCs e às células da granulosa (MILES et al., 2012). Outro estudo mostrou que o miR-133b tem como alvo o *TAGLN2* reduzindo os níveis transcritos deste gene e regulando a expressão da proteína actina durante o crescimento e a maturação oocitária (XIAO et al., 2014).

Assim, fica evidente que os miRNAs são moléculas importantes no detalhado processo de desenvolvimento folicular. Evidências recentes sugerem que os miRNAs também podem transmitir mensagens e serem enviados de uma célula a outra no ambiente folicular através das junções gap, das projeções presentes na zona pelúcida ou mesmo através das vesículas secretadas por células, complementando a comunicação celular, mecanismo fundamental para que o folículo complete com sucesso a foliculogênese.

2.5 A via de sinalização PI3K-Akt

A via fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3K-Akt) é uma via de sinalização que possui papel importante em respostas celulares de proliferação celular, metabolismo de glicose, apoptose, reparo de DNA e síntese proteica (Figura 4). O principal regulador positivo desta via é o PI3K que ativa a Akt pela sua fosforilação. A ativação da Akt regula o crescimento celular, a diferenciação e também está relacionada com a sobrevivência em vários tipos celulares (DATTA et al., 1997; KULIK et al., 1997; NERI et al., 2002).

Figura 4 – representação esquemática dos principais componentes da via de sinalização PI3K-Akt e suas funções celulares.

Própria autoria.

A regulação negativa da atividade da via PI3K-Akt é, principalmente, pelo PTEN (Fosfatase homóloga à tensina), o qual atua na conversão do PIP3 em PIP2, e altos níveis de PTEN determinam a redução a atividade da Akt, consequentemente reduzindo a proliferação celular (MAEHAMA, DIXON, 1998). Adicionalmente, há indicação experimental de que miRNAs estão também envolvidos na regulação da via PI3K-Akt, representando uma camada extra de complexidade no sistema de regulação desta via (XU; MO, 2012).

Evidências sugerem que, no ambiente folicular, a via de sinalização PI3K-Akt é uma das responsáveis por desencadear o crescimento oocitário através da ativação da PI3K e da Akt e consequentemente, inibição da *PTEN* (CLARKE, 2017). Além disso, a sinalização da PI3K age como uma reguladora crítica da função dos COCs modulando a manutenção ou ativação dos oócitos e a proliferação, diferenciação e resposta ao estresse em células de granulosa (MAKKER et al., 2014). A desregulação contribui para a infertilidade ocasionada por um prejuízo no

desenvolvimento folicular, no desenvolvimento de oócitos e na ovulação (ZHENG et al., 2012; MAKKER et al., 2014).

Nas células da granulosa, foi descrito que vesículas extracelulares de folículos pequenos, através da ativação de algumas vias, dentre elas a PI3K-Akt, aumenta a proliferação (HUNG et al., 2017) e que o FSH aumenta a fosforilação e a ativação da Akt dependente de AMPc e de PI3K (GONZALEZ-ROBAYNA et al., 2000).

Nas células do cumulus, de suínos, foi observado que a inibição da atividade da PI3K, durante a maturação, interfere com a retomada da meiose estimulada por gonadotrofinas (SHIMADA; TERADA, 2001) e também, que a inibição da sinalização da PI3K-Akt mediada pelos receptores de EGFs, aumenta a apoptose (PARK et al., 2017). Além disso, foi descrito nas células do cumulus de camundongos, que o IGF1 através da ativação da via PI3K-Akt promove a expansão celular e, nos oócitos a maturação nuclear (LI et al., 2016).

Nos oócitos, a atividade da via PI3K-Akt promove a sobrevivência através de mecanismos que envolvem respostas citoplasmáticas anti-apoptóticas (ROSSI et al., 2017) e, embora existam alguns estudos, o papel da via sinalização PI3K-Akt em oócitos durante a maturação não está totalmente esclarecido.

3 HIPÓTESES

3.1 Hipótese do Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”

As células da granulosa, os complexos cumulus-oócitos e suas respectivas vesículas extracelulares possuem perfil de miRNAs diferentes e esses miRNAs regulam vias celulares importantes durante o processo de foliculogênese e maturação oocitária.

3.2 Hipótese do Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”

A via de sinalização PI3K-Akt, previamente demonstrada como regulada por miRNAs no ambiente folicular, possui relação positiva, em células foliculares, com a qualidade oocitária em bovinos.

3.3 Hipótese do Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”

O perfil de miRNAs e de RNAs mensageiros das células do cumulus se altera de acordo com a capacidade do oócito em clivar e desenvolver-se até o estágio de blastocisto.

3.4 Hipótese do Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”

*O ambiente *in vitro* e a qualidade oocitária alteram os níveis de expressão de alguns transcritos em células do cumulus.*

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos do Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs, das células e das vesículas extracelulares, no microambiente do folículo ovariano bovino”

Objetivo Geral

- Identificar a origem dos miRNAs presentes no ambiente folicular e as vias que estão sendo reguladas por estes miRNAs e esclarecer as funções e a importância dos miRNAs no ambiente folicular durante o desenvolvimento do folículo e do oócito.

Objetivos Específicos

- Identificar e comparar a expressão dos miRNAs e as vias reguladas por eles nas células da granulosa e no complexo cumulus-oócito assim como nas vesículas extracelulares secretadas por ambos tipos celulares.
- Comparar os miRNAs provenientes das células da granulosa e dos complexos cumulus-oócito com os miRNAs identificados nas vesículas extracelulares do fluido folicular.

4.2 Objetivos do Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”

Objetivo geral

Determinar os níveis de componentes da via PI3K-Akt em células foliculares de folículos ovarianos contendo oócitos com distintas capacidades de desenvolvimento.

Objetivos específicos

- Determinar se a via de sinalização PI3K-Akt, altamente regulada por miRNAs no ambiente folicular, tem relação com a qualidade oocitária.

- Identificar possíveis marcadores moleculares (miRNAs e/ou mRNAs) de qualidade oocitária relacionados à via de sinalização Pi3K-Akt.

4.3 Objetivos do estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”

Objetivo Geral

Conhecer o perfil de miRNAs e mRNAs de células do cumulus associadas a oócitos competentes e incompetentes.

Objetivos específicos

- Definir o perfil de mRNAs de células do cumulus associadas a oócitos com diferentes capacidades de desenvolvimento.
- Comparar as diferenças entre os perfis de expressão gênica entre os grupos experimentais.
- Comparar as vias mais ativas, de acordo com as análises de bioinformática, nas células do cumulus que podem influenciar na aquisição de competência oocitária.
- Conhecer as diferenças entre os perfis de miRNAs de células do cumulus associadas a oócitos com diferentes capacidades de desenvolvimento.
- Destacar vias e/ou miRNAs mais expressos em células do cumulus relacionadas aos oócitos de maior competência ao desenvolvimento.
- Identificar, através de ferramentas de bioinformática, possíveis interações entre transcritos alterados de acordo com a qualidade e seus miRNAs reguladores.
- Identificar possíveis marcadores não invasivos de qualidade oocitária.

4.4 Objetivos do Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”

Objetivo Geral

Avaliar a diferença na expressão de alguns mRNAs em células do cumulus de oócitos de diferentes capacidades ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto

in vitro com células do cumulus de oócitos maturados *in vivo*.

Objetivos específicos

- Comparar as diferenças dos perfis de expressão de mRNAs entre os grupos experimentais.
- Identificar mRNAs que são alterados nas células do cumulus devido à maturação *in vitro*.
- Comparar as funções celulares mais ativas, identificadas pelas análises de bioinformática, nas células do cumulus de oócitos dos diferentes grupos de qualidade para identificar possíveis funções celulares que estejam interferindo no processo de aquisição de qualidade.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs, das células e das vesículas extracelulares, no microambiente do folículo ovariano bovino”

Figura 5 - Fluxograma do experimento demonstrando a origem das amostras dos grupos experimentais e as posteriores análises do estudo 1.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: COCs = complexos cumulus-oócito; CGs = células da granulosa; COC-VE = vesículas extracelulares derivadas do cultivo de complexos cumulus-oócito; GC-VE vesículas extracelulares derivadas do cultivo de células da granulosa.

5.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”

Figura 6 - Fluxograma do experimento demonstrando a origem das amostras dos grupos experimentais e as posteriores análises do estudo 2.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: COCs = complexos cumulus-oócito; MIV = maturação *in vitro*; NC = embriões (zigotos) derivados de oócitos MIV+ e que não clivaram; CNB = embriões que após a ativação partenogenética apresentaram clivagens mas não atingiram a fase de blastocisto; BL = blastocisto; CF = células foliculares; p-Akt = proteína Akt fosforilada.

5.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”

Figura 7 - Fluxograma do experimento demonstrado a origem das amostras dos grupos experimentais e as posteriores análises do estudo 3.

5.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”

Figura 8 - Fluxograma do experimento demonstrado a origem das amostras dos grupos experimentais e as posteriores análises do estudo 3.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Informações gerais

Os experimentos foram desenvolvidos nas dependências do Laboratório de Morfofisiologia Molecular de Desenvolvimento (LMMD) no Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-USP, no Campus Fernando Costa. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e de Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP) com o número de protocolo 14.1.674.74.0). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios Orientadores Internacionais para a Investigação Biomédica Envolvendo Animais (Sociedade para o Estudo da Reprodução – SSR). Os reagentes e meios de cultivo utilizados foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), quando não for o caso a origem será citada.

6.2 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs das células e das vesículas extracelulares no microambiente do folículo ovariano bovino”

6.2.1 *Dissecção dos folículos e coleta das células*

Foram utilizados ovários bovinos provenientes abatedouros da região de Pirassununga. Os ovários foram coletados e mantidos em solução salina pré-aquecida até o momento da dissecção. Folículos com diâmetro entre 3 e 6 mm, normalmente utilizados para a produção *in vitro* de embriões foram dissecados e posteriormente rompidos, utilizando agulhas 18G, sob estereomicroscópio. Os experimentos de cultivo celular e as análises do fluido folicular foram feitos usando amostras de ovários de rotinas independentes.

6.2.2 *Cultivo das células da granulosa e dos complexos cumulus-oócito*

O cultivo das células foi feito de acordo com o protocolo já estabelecido na literatura (GUTIERREZ et al., 1997; PORTELA et al., 2010). Para esse experimento foram feitas 5 rotinas e por rotina foram dissecados e rompidos aproximadamente 30 folículos. As células da granulosa foram coletadas da placa de acordo com a aparência de folhas e separadas do fluido folicular após centrifugação (300xg, 8 min). O pellet foi ressuscitado em DMEM-F12 suplementado com albumina sérica bovina (1mg/ml), ITS supplement (100x, 0,1µl/ml; contendo 1mg/ml de insulina

bovina, 0,55mg/ml de transferrina humana e 0,5µg/ml de selenito de sódio), penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100mg/ml), fungizona (1mg/ml), solução de aminoácidos não essenciais (MEM, 1.1mM) e androstenediona (10^{-7} M). As células viáveis foram contadas usando Trypan Blue (Gibco) e aproximadamente 5×10^5 de células da granulosa foram plaqueadas e cultivadas em 500µl do meio DMEM suplementado, já descrito, em placas de 4 poços (Nunc). Já os COCs foram lavados em grupos de 10 e posteriormente cultivados também em 500µl do meio DMEM suplementado em placas de 4 poços (Nunc). O meio de cultivo foi trocado após 24 horas de cultivo e após 48 horas, na segunda troca do meio, o hormônio folículo estimulante (FSH, 1ng/ml) foi adicionado ao cultivo dos dois tipos celulares. O objetivo desta suplementação foi que ao final do período de cultivo estas células fossem similares as células de folículos em crescimento. As células, GCs e COCs, e o meio de cultivo foram coletados após 48 horas do tratamento do FSH e armazenados, já em Trizol®, no freezer -80°C até o momento da extração de RNA.

6.2.3 Coleta do fluido folicular

Para a coleta do fluido folicular foram aspirados folículos ovarianos bovinos com diâmetro 3 a 6 mm de ovários provenientes de abatedouro. A coleta do fluido folicular foi realizada independente das rotinas de coletas de GCs e COCs. Após a coleta as amostras de fluido folicular foram agrupadas e processadas para o adequado isolamento das VEs como descrito abaixo. Foram preparadas oito amostras de FF sendo cada uma proveniente de aproximadamente 20 folículos.

6.2.4 Isolamento das vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares foram isoladas do meio de cultivo das GCs (n=5), do meio de cultivo dos COCs (n=5) e do fluido folicular (n=8) através do protocolo de centrifugação diferencial e ultracentrifugação previamente descrito por Crescitelli e colaboradores (CRESCITELLI et al., 2013) com algumas pequenas modificações.

Cada amostra (4ml dos meios de cultivo e 0,250ml do fluido folicular), no momento da coleta, foi submetida a três etapas de centrifugações consecutivas (300xg por 10min; 2.000xg por 10min; e 16.500xg por 30min). Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado (filtro de 0,22µm) e ultracentrifugado (100.000xg por 70min), o pellet proveniente da centrifugação foi lavado com PBS e ultracentrifugado novamente (100.000xg por 70min) (Figura 9). Posteriormente, as vesículas obtidas

foram ressuspensas em PBS e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo de centrifugação e ultracentrifugação para o isolamento das vesículas extracelulares.

Fonte: Própria autoria.

6.2.5 Validação das vesículas extracelulares

Para validar o protocolo de extração as vesículas extracelulares foram avaliadas quanto ao tamanho, à concentração e à presença de proteínas marcadoras de membranas vesiculares.

6.2.5.1 Análises por Nanosight

As vesículas extracelulares foram validadas quanto ao tamanho e à concentração usando o equipamento NanoSight (Malvern) e analisadas utilizando o programa NanoSight NTA Software v3.1. Os vídeos foram gravados com a câmera no nível 14, na temperatura ambiente (25°C). Previamente às amostras checamos o equipamento utilizando padrões de 50nm, 100nm e 150nm (beads, Malvern). As amostras foram introduzidas manualmente e foram analisadas por vídeos (3 a 5) de 30s de duração. As VEs foram diluídas na proporção de 1:500 em PBS.

6.2.5.2 Western Blotting

Para a detecção, nas vesículas extracelulares, de proteínas marcadoras foram feitas análises de Western Blotting para as proteínas Alix e CD63. A fração orgânica das amostras durante a extração de RNA utilizando o reagente TRI-reagent BD (Molecular Research Center, Inc.) foi armazenada e posteriormente purificada. As

amostras foram aplicadas em gel de 12% SDS-Poliacrilamida. A eletroforese foi realizada a 100 V por 70 min. As proteínas foram transferidas para uma membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF) utilizando o aparelho de transferência semi-seco, Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com solução de TBST (100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 50 mM Tris, pH 7.4) com 5% de BSA e incubadas durante a noite com o anticorpo primário, Alix (SC-49267) e CD63 (SC-15363), diluído em TBST com 1% de BSA. Posteriormente as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min com TBST e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário, anti-goat (SC-2020) e anti-rabbit (#7074S) respectivamente, também diluídos em TBST com 1% de BSA. Novamente as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min com a solução de TBST. Por fim, para a detecção das bandas as membranas foram submetidas à reação de quimiluminescência utilizando o Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad). O equipamento ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad,) e o software Image Lab 5.1 foram usados para a aquisição das imagens e densitometria das bandas.

6.2.6 Extração do RNA total

O RNA total das amostras (incluindo mRNAs e miRNAs) foi extraído utilizando o reagente TRI-reagent BD (Molecular Research Center, Inc.) seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. O RNA extraído foi dissolvido em 10µl de água livre de RNase e tratados com DNase I (Life Technologies) para prevenir contaminações com DNA. A concentração de RNA foi mensurada no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e a qualidade foi avaliada pela razão 260/280.

6.2.7 Transcrição reversa e análise dos microRNAs por qPCR em tempo real (RT-qPCR)

A transcrição reversa foi feita utilizando 100ng do RNA total. Foi utilizado o miScript Starter Kit (Qiagen, Venlo & Limburg, Holanda) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi incubado com 5X miScript HiFlex buffer, 10X miScript nucleic acids mix, água RNase-free, e com a enzima miScript Reverse transcriptase a 37°C por 60 min seguido de 5 min a 95°C e, posteriormente mantido a 4°C.

Através das reações de RT-qPCR foram analisados os níveis de expressão de 348 miRNAs alvos e de três miRNAs controles (miR-99b, RNU1 e RNU43). A lista completa dos miRNAs analisados e as sequências de primers utilizados está no apêndice A. As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µL contendo 2X Quantitec SYBR Green (Qiagen), 10 µM do *primer* reverso Universal (Qiagen), 10 µM do primer senso específico para cada miRNA e 0,1µl de cDNA. As reações foram feitas em placas de 96 poços utilizando o equipamento ABI-7500 (Applied Biosystems). As condições de temperatura e ciclagem foram 95°C por 15 min, 45 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 30s, 70°C por 30s; seguidos da análise das curvas de dissociação.

As amostras das células GC e COC e das suas respectivas vesículas GC-VEs e COC-VEs foram analisadas em triplicatas e apenas miRNAs com valor de Ct menores que 37 e que foram detectados em pelo menos duas amostras de um mesmo grupo foram considerados presentes. Os valores de Ct dos miRNAs nas células foram normalizados pela média geométrica dos três miRNAs controles. Já os valores de Ct das vesículas extracelulares foram normalizados pela média geométrica do apenas do miR-99b e do RNU1. A expressão foi calculada usando o métodos de $2^{-\Delta Ct}$.

6.2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas usando o SAS 9.3 Software (SAS Institute). O teste t de Student foi usado para conhecer as diferenças estatísticas e a normalidade dos dados foi verificada usando o teste de Shapiro-Wilk. A diferença estatística de 5% foi considerada significativa.

6.2.9 Análise de bioinformática dos miRNAs de acordo com sua origem

As análises de bioinformática foram realizadas para identificar vias reguladas por miRNAs nas células foliculares e nas vesículas por elas secretadas. A homologia entre os miRNAs bovinos e humanos foi feita usando o site miRBase (www.mirbase.org) (Apêndice B) e as vias de sinalização associadas aos miRNAs foram identificadas usando o software mirPath dentro do site DIANA tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath>).

6.3 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos

6.3.1 *Maturação oocitária, ativação partenogenética e cultivo embrionário individual*

Ovários foram recuperados em abatedouro e mantidos em solução salina a temperatura ambiente até o momento da dissecação. Folículos de 3 a 6 mm de diâmetro foram dissecados. Após ruptura do folículo os COCs foram coletados para maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro* individuais, conforme descrito a seguir. As células foliculares (CFs) foram coletadas, lavadas por centrifugação (600xg por 8min) para remoção do líquido folicular e armazenadas em nitrogênio líquido para futuras análises de modo retrospectivo de componentes da via PI3K-Akt. Os COCs recuperados após dissecação folicular foram lavados em TCM-199 (Tissue Culture Medium-199; GIBCO BRL) tamponado com 25mM de HEPES e suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), 0.2 mM de piruvato de sódio e 50µg/mL de gentamicina.

Os COCs foram maturados individualmente em microgotas de 9 µL de meio de maturação (TCM-199) tamponado com bicarbonato e suplementado com 10% de SFB, 0.2 mM piruvato de sódio, 50 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) (Folltropin-V, Bioniche Animal Health Belleville, Canada) e 50 µg/mL de hCG (Vetcore®, Hertape Calier), sob óleo mineral a 38.5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar.

Após 19 horas de MIV os oócitos foram individualmente desnudos em solução de 0.2% de hialuronidase em PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺. Os oócitos foram classificados como maduros (MIV+) ou não-maduros (MIV-) baseando-se na presença ou ausência do primeiro corpúsculo polar (1.CP). Oócitos desnudos foram lavados em meio de maturação e retornados à incubadora até o momento da ativação partenogenética com 26 horas após o início da maturação *in vitro*.

Todos os oócitos desnudos foram ativados, independentemente do status após a MIV. Para ativação foram lavados três vezes em meio TCM-199 tamponado com HEPES e suplementado com 0.5 mg/mL de BSA (albumina sérica bovina), 0.2 mM de piruvato de sódio e 10 µg/mL de gentamicina. Após lavagem, a ativação foi induzida no mesmo meio suplementado com 5 mM de ionomicina por 5 minutos, seguido de lavagens em TCM-199 saturado com BSA (TCM-199 com 25 mM Hepes, 30 mg/mL de BSA, 0.2 mM de piruvato de sódio e 10µg/mL de gentamicina) para remoção da ionomicina. Os oócito foram na sequência lavados em meio SOF (fluido de oviduto sintético) suplementado com 5 mg/mL de BSA, 2.5% de SFB, 0.2 mM de piruvato de sódio, 10 mg/mL de gentamicina e 2 mM 6-dimetilaminopurina (6DMAP) e mantidos individualmente em microgotas de 9µL de SOF suplementado com 6DMAP por 3 horas a 38.5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar.

Ao final da ativação os oócitos foram lavados em meio SOF suplementado com 5 mg/mL de BSA, 2.5% de SFB, 0.2 mM de piruvato de sódio e 10 µg/mL de gentamicina e co-incubados em monocamada de células do cumulus na mesma placa contendo microgotas de 9µL de meio SOF recém adicionado, cobertas por óleo mineral e mantidas em incubadora a 38.5°C e atmosfera úmida de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ por 8 dias. Os embriões foram avaliados com 48h após ativação (dia 2 – D2), 168h após ativação (D7) e 192h após ativação (D8).

Apenas rotinas com taxas de blastocistos/clivados maiores que 30% tiveram suas amostras utilizadas. Os oócitos/embriões e suas respectivas células foliculares de acordo com a competência ao desenvolvimento foram classificados e separados em três grupos: Grupo NC: embriões (zigotos) de uma célula, derivados de oócitos maduros (MIV+) e que não clivaram após a ativação partenogenética; Grupo CNB: embriões que clivaram após ativação partenogenética mas que pararam o desenvolvimento antes da fase de blastocisto; Grupo BL: embriões que se desenvolveram até a fase de blastocisto.

6.3.2 Extração de RNA e proteínas

RNA total (mRNA e miRNA) e proteínas foram extraídas usando TRI-reagent ou TRI-reagent BD (Molecular Research Center, Inc.) de acordo com instruções do fabricante e com algumas modificações. O RNA foi dissolvido em 10 µL de RNase free water. O RNA total foi tratado com DNase I (Life Technologies) para eliminar eventuais contaminações com DNA. A concentração do RNA foi determinada com a absorbância a 260nm (A260) utilizando o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Um microlitro da solução de RNA foi analisado de acordo com o protocolo do fabricante. As proteínas foram precipitadas a partir da fase orgânica gerada pela lise utilizando o TRI-reagent, dissolvidas em 20 µL de solução de uréia a 3 M e quantificadas por reagente de Bradford (Bio-Rad) de acordo com o protocolo do fabricante.

6.3.3 Transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) e do microRNA (miRNA)

A transcrição reversa do mRNA foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Aproximadamente 400ng do RNA total foi incubado com 10X RT buffer, 25X dNTP mix (100 mM), 10X RT primer randômico e água nuclease-free, conforme recomendado pelo fabricante, a 25°C por 10 min e 37°C por 120 min seguido de 5 min a 85°C. Para os miRNAs, foi utilizado o

kit miScript Polymerase Chain Reaction (PCR) System (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. 100ng do RNA total foi incubado com 5X miScript HiFlex buffer, 10X miScript nucleic acids mix, água RNase-free, e miScript Reverse Transcriptase a 37°C por 60 min seguido de 5 min a 95°C.

6.3.4 Análises dos mRNAs e miRNAs por RT-qPCR

Foram escolhidos alguns RNAs mensageiros relacionados à diferentes funções celulares reguladas pela via de sinalização PI3K-Akt. A amplificação desses mRNAs alvos por PCR foi realizada com o cDNA resultante e conjuntos de primers senso e anti senso específicos para os genes alvo, conforme o quadro 1. A quantificação relativa dos transcritos foi realizada em equipamento de PCR em tempo real modelo ABI-7500 (Applied Biosystems) com um passo de desnaturação a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 95°C por 15s. Curvas de dissociação foram executadas para garantir a especificidade dos produtos gerados. Para identificar diferenças entre grupos, os valores de Ct foram normalizados pelo gene de referência endógeno ACTB, conforme descrito para tecidos similares (SANGALLI et al., 2014). Os resultados normalizados, realizados em quadruplicata, foram utilizados para calcular a expressão relativa dos genes através da transformação $2^{-\Delta Ct}$.

Quadro 1 – Sequência dos primers de RNAs mensageiro bovinos utilizados nas reações de amplificação por tempo real.

Gene	Sequência dos primers (5'–3')	Frag. (pb)	N. acesso.	Referência
<i>ACTB</i>	FP: CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC RP: AACGCAGCTAACAGTCCGCC	91	NM_173979.3	(SANGALLI et al., 2014)
<i>BAX</i>	FP: CCCGAGTTGATCAGGACCAT RP: CACTCCAGCCACAAAGATGG	153	NM_173894.1	Desenhado neste trabalho
<i>BCL-2</i>	FP: CTTTGTGGAGCTGTATGGC RP: CCAGATAGGCACCCAGGG	119	NM_001166486.1	Desenhado neste trabalho
<i>BRCA</i>	FP: CTGCATGCCCTGACAGTCCT RP: CCCCATCGCACGAGTCATCA	132	NM_178573.1	Desenhado neste trabalho
<i>CDK6</i>	FP: CTCCGAGGCCTGGACTTTCT RP: GATGCGAGCAAGGCCGAA	120	NM_001192301.1	Desenhado neste trabalho
<i>EIF4b</i>	FP: ACGACTCCAGATCTGCACCTG RP: TCTTCACCGTCAATGGCGAGA	103	NM_001035028.2	Desenhado neste trabalho
<i>EIF4e</i>	FP: TTAATGCCTGGCTGTGACTAC RP: ACGATCGAGGTCACCTTCGTCT	132	NM_174310.3	Desenhado neste trabalho
<i>FOXO3a</i>	FP: CGAAGTGGAGCTAGACCCGG RP: CGGGGATCATGGAGTCAGCA	134	NM_001206083.1	Desenhado neste trabalho
<i>PI3K</i>	FP: ACACAGCTGACGGGACCTTT RP: CCATATTTCCCATCTCGGTGA	127	NM_174575.1	Desenhado neste trabalho
<i>PTEN</i>	FP: GCCACAAAGTGCCCTCGTTTACC RP: AGAAGGCAACTCTGCCAAACAC	120	XM_613125.6	(SHARMA; SINGH, 2012)
<i>YWHAZ</i>	FP: GCATCCACAGACTATTTCC RP: GCAAAGACAATGACAGACCA	120	GU817014.1	Desenhado neste trabalho

Fonte: Própria autoria.

ACTB – Beta actin; *BAX* – BCL-2-associated X protein; *BCL-2* – B cell leukemia/lymphoma 2; *BRCA* – Breast cancer 2; *CDK6* – Cyclin-dependent kinase 6; *EIF4b* – Eukaryotic translation initiation factor 4B; *EIF4e* – Eukaryotic translation initiation factor 4E; *FOXO3a* – Forkhead box O3; *PI3K* – Phosphatidylinositol 3-kinase; *PTEN* – Phosphatase and tensin homolog; *YWHAZ* – Tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta

Para os miRNAs a amplificação por PCR em tempo real e a normalização foram semelhantes ao anteriormente descrito para obtenção dos perfis de expressão de miRNAs no estudo 1. Resumidamente, as amplificações de cDNA em tempo real foram realizadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 10 µM de primer reverso universal (Qiagen) e primer específico para os miRNAs alvos (Quadro 2) e 0.1 µL cDNA (diluído 1:4). Reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o equipamento ABI-7500 (Applied Biosystems). As condições de termociclagem foram: 95°C por 15 min e 45 ciclos de 94°C por 15 s, 55 °C por 30 s e 70 °C por 30 s, seguido de curva de dissociação para confirmar a especificidade dos produtos de amplificação do cDNA. Os valores de Ct foram normalizados pela média geométrica de dois miRNAs de referência (miR-99b e RNU1) e a expressão relativa calculada pela transformação $2^{-\Delta Ct}$. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Quadro 2 – Sequência dos primers de microRNAs bovinos utilizados nas reações de amplificação por tempo real.

miRNA	Sequência do primer senso (5'–3')
<i>miR-17-5p</i>	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
<i>miR-17-3p</i>	ACUGCAGUGAAGGCACUUGU
<i>miR-18a</i>	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUAU
<i>miR-19a</i>	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA
<i>miR-20a</i>	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
<i>miR-494</i>	UGAAACAUACACGGGAAACCUC
<i>miR-92a</i>	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
<i>miR-92b</i>	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC
<i>miR-99b</i>	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG
<i>RNU 1</i>	CGACUGCAUAAUUUGUGGUAGUGG

Fonte: Própria autoria.

6.3.5 Validação do gene alvo através do ensaio de luciferase

Para validar experimentalmente a interação miRNA-mRNA entre bta-miR-494 e o gene PTEN, construímos um vetor plasmídico com um fragmento da 3'-UTR que abriga os sítios de ligação conservados de bta-miR-494 (selvagem) ou com fragmento com variantes mutantes das sequências de ligação (mutante) inseridas entre os sítios de restrição SacI e XhoI do vetor de expressão do alvo de miRNA do *pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* (Promega, Madison,

USA). Os plasmídeos foram amplificados e sequenciados para verificar a presença e ausência de locais de ligação do miRNA no tipo selvagem e nas construções mutantes, respectivamente. Os ovários foram obtidos a partir do matadouro local e as células da granulosa foram aspiradas a partir de pequenos folículos em crescimento e cultivadas em placas de 24 poços como anteriormente no estudo 1. As células sub-confluentes foram co-transfectadas com a construção de tipo selvagem ou a construção mutante na presença ou ausência de bta-miR-494 usando o reagente de transfecção de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Darmstadt, Alemanha). Após 24 h, as células tratadas foram lisadas por adição de 75 µL de tampão de lise passivo 1X (PLB) e agitação durante 15 minutos à temperatura ambiente. A atividade da luciferase de fluorescer e da renilla foi determinada usando o kit de análise de luciferase Dual-Glo (Promega, Madison, WI, EUA) dispensando 20 µL do lisado de proteína seguido de 100 µL de reagente de análise de luciferase (LAR) e 100 µL Stop & Glo reagente. Os dados foram calculados como a relação entre luciferase e atividade de renilla e comparados com o grupo transfectado com apenas vetor vazio.

6.3.6 Detecção da proteína Akt fosforilada por Western Blotting

As amostras proteicas foram separadas em gel de 12% de SDS-poliacrilamida para detecção da proteína Akt fosforilada (p-Akt) e β -Actina. As proteínas foram, na sequência, transferidas para membranas de PVDF utilizando o sistema Trans-Blot® Turbo (Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas com 5% de BSA em TBST (100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 50 mM Tris, pH 7.4) por 1 h e incubadas overnight a 4°C com anticorpo primário em TBST com 1% BSA. O anticorpo primário utilizado foi p-Akt1/2/3 (Ser 473), um anticorpo policlonal IgG de coelho (Santa Cruz Biotechnology), em diluição de 1:200 (número de catálogo SC-101629) para a detecção da proteína p-Akt de aproximadamente 60kDa. As membranas foram, em seguida, lavadas 3 vezes em TBST, incubadas por 1 h em temperatura ambiente com anticorpo IgG anti-coelho conjugado com HRP (número de catálogo #7074S - Cell Signaling) em TBST com 1% BSA, e lavadas mais três vezes em TBST. Finalmente, as membranas foram incubadas por 3 h em temperatura ambiente com anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -Actina (ACTB) conjugado com peroxidase (número de catálogo A3854 - Sigma-Aldrich) para detecção a proteína de ACTB de 43kDa, utilizada na normalização do resultado. As membranas foram lavadas mais três vezes em TBST e tratadas com Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) para visualização das proteínas.

6.3.7 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM das replicatas. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS 9.3 (SAS Institute). Para determinar as diferenças estatísticas ANOVA foi realizada respeitando as premissas de normalidade dos resíduos e homocedasticidade. Médias foram comparadas pelo teste de Duncan. Quando as premissas da ANOVA não eram atendidas os dados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Exceto se diferentemente indicado, o nível de significância utilizado foi de 5%.

6.4 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”

6.4.1 *Maturação oocitária, ativação partenogenética e cultivo embrionário individual*

O estudo 3 é um estudo retrospectivo de qualidade oocitária em células do cumulus. O protocolo utilizado para a maturação oocitária, ativação partenogenética e o cultivo embrionário individual foi igual ao descrito no item 6.3.1 desta tese. As células do cumulus de cada oócito foram coletadas separadamente após a maturação oocitária, no momento em que os oócitos foram desnudados para a avaliação da presença ou não do primeiro corpúsculo polar para avaliação da maturação.

6.4.2 *Extração de RNA total e transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA)*

Para o RNAseq foram utilizados 4 pools, por grupo de qualidade oocitária, de células do cumulus provenientes de 10 complexos cumulus-oócitos. E, para as análises de RT-qPCR dos miRNAs, foram utilizados 3 pools com amostras de células do cumulus provenientes de 5 complexos cumulus-oócito de cada grupo experimental. Depois do isolamento do RNA mediante o TRIzol, este foi misturado com 100% de etanol e a extração foi prosseguida utilizando o kit comercial miRNeasy mini kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A concentração RNA foi mensurada no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e a qualidade foi avaliada pela razão 260/280.

A transcrição reversa do mRNA foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). O RNA total foi incubado com

10X RT buffer, 25X dNTP mix (100 mM), 10X RT primer randômico e água nuclease-free, conforme recomendado pelo fabricante, a 25°C por 10 min e 37°C por 120 min seguido de 5 min a 85°C. Para os miRNAs, foi utilizado o kit miScript Starter kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Nas reações, 100ng do RNA total foi incubado com 5X miScript HiFlex buffer, 10X miScript nucleic acids mix, água RNase-free, e miScript Reverse Transcriptase a 37°C por 60 min seguido de 5 min a 95°C.

6.4.3 Análise do perfil de RNAs por sequenciamento de RNA

Para a avaliação e pré-preparação, os dados obtidos pelo HiSeq 2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisados pelo programa Real Time Analysis (fornecido pela Illumina), que faz o *base call* das imagens do sequenciamento, convertendo-as em sequências no formato fastq, com cada base acompanhada de um escore de qualidade Phred (EWING; GREEN, 1998). Após a conversão para fastq, a avaliação inicial das leituras do sequenciamento foi feita com o programa FastQC versão 0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A filtragem das bases com qualidade baixa, das sequências de adaptadores e de vetores foi feita com o programa BBDuk, do pacote BBTools versão 37.17 (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). O banco de dados de vetores usado foi o UniVec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/>). Leituras menores que 75 pares de bases após filtragem foram removidas.

Após a filtragem, as leituras do sequenciamento de cada amostra foram alinhadas contra o genoma bovino versão UCSC bosTau8, obtida na página iGenomes da Illumina (http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html) (DOBIN et al., 2013). O mapeamento e contagem das leituras foi feito com o programa STAR versão 2.5.3a. Leituras com mapeamento ambíguo foram descartadas na contagem utilizada para a estimativa de expressão gênica diferencial.

Após obtenção das contagens, a análise de expressão gênica diferencial foi realizada com o programa DESeq2 versão 1.14.1 (LOVE et al., 2014), um pacote do R/Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004). De maneira resumida, 1) as contagens obtidas pelo STAR foram lidas no R; 2) genes com contagens muito baixas foram removidos da análise; 3) as contagens de cada biblioteca foram normalizadas em relação à profundidade de sequenciamento de cada amostra; 4) os dados foram descritos por um modelo linear generalizado (GLM), ajustando uma binomial negativa; 5) aplicou-se filtragem independente automática dos dados (BOURGON et

al., 2010), o que diminui o número de testes realizados e aumenta o poder da análise; 6) e finalmente um teste Wald foi usado para testar expressão diferencial gene a gene entre os contrastes de interesse, com os *p-values* sendo corrigidos com o critério de taxa falsa descoberta (FDR) para controlar a quantidade de falsos positivos (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

O teste de enriquecimento de categorias GO (ASHBURNER et al., 2000) e vias metabólicas KEGG (KANEHISA; GOTO, 2000) foi feito com os pacotes do R/Bioconductor GSVA versão 1.22.4 (HANZELMANN et al., 2013) e limma versão 3.30.13 (Smyth). GSVA faz uma transformação dos dados, calculando escores de enriquecimento levando em conta os genes dentro e fora de cada conjunto de genes. Com esta transformação, os dados de expressão dos genes individuais são reduzidos para escores representando conjuntos de genes. Adicionalmente, esta transformação normaliza o dados, de forma que estes escores podem ser analisados com o pacote limma. Embora limma tenha sido desenvolvido para ajustar modelos lineares a dados de microarranjos, ele pode ser usado com qualquer conjunto de dados que preencha os pressupostos requeridos.

6.4.4 *Análise por RT-qPCR dos miRNAs*

A expressão relativa de 384 miRNA maduros bovinos, incluindo 3 miRNAs endógenos, foram avaliados nas células do cumulus de oócitos de diferentes capacidades ao desenvolvimento. De forma semelhante ao perfil feito no estudo 1, as reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µL contendo 2X Quantitec SYBR Green (Qiagen), 10 µM do *primer* reverso Universal (Qiagen), 10 µM do primer forward específico para miRNA (Apêndice A e C), e 0.03 µL do cDNA diluído 1:4. As reações foram analisadas utilizando-se o QuantStudio 6 Flex PCR System. O programa utilizado para as reações foi: 95°C por 15 min e 45 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 30s e 70°C por 30s e a amplificação foi confirmada mediante análises da curva de dissociação. Os valores de Ct foram normalizados utilizando a média geométrica de *RNU43* snoRNA, Hm/Ms/Rt U1 snRNA, e bta-miR-99b. A expressão foi calculada usando o método de $2^{-\Delta Ct}$. Os ensaios foram realizados em triplicata.

6.4.5 *Análise estatística*

Nas análises de expressão de mRNA e miRNA os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Tukey. A homogeneidade das variâncias foi testada utilizando-se o teste Levene e a

normalidade foi mensurada com o teste Shapiro-Wilk. Todas as análises foram realizadas no software SAS (SAS Institute Inc.) e o nível de significância foi considerada 5% para todos os testes.

6.5 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”

6.5.1 Amostras de células do cumulus relacionadas à qualidade oocitária

O estudo 4 é um estudo retrospectivo de qualidade oocitária em células do cumulus. O protocolo utilizado para a maturação oocitária, ativação partenogenética e o cultivo embrionário individual foi igual ao descrito no item 6.3.1 desta tese. Para as análises de expressão gênica por microfluídica foram utilizados 3 pools de cada grupo (NC, CNB e BL) com amostras de células do cumulus provenientes de 5 COCs.

6.5.2 Obtenção de células do cumulus após maturação *in vivo*

Nas análises de expressão genica por microfluídica do estudo 4 foram incluídas amostras de células do cumulus provenientes de oócitos maturados *in vivo*. Para a coleta dos COCs maturados *in vivo* a onda ovariana, de dez fêmeas bovinas mestiças, foi sincronizada e os animais foram submetidos ao protocolo descrito a seguir.

No primeiro dia (D0), as vacas receberam 0,5mg de cloprostenol (Sincrocio, Ourofino Saúde Animal) e a onda folicular foi sincronizada mediante ablação folicular juntamente com a administração de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, OuroFino Saúde Animal) e a inserção do implante de progesterona intravaginal (Sincrogest, OuroFino Saúde Animal).

No D6 do protocolo, no período da tarde, foi administrado 0,5mg de cloprostenol e 12 horas depois o implante de progesterona foi retirado (D7 de manhã). No oitavo dia do protocolo (D8), foi administrado 0,02mg de acetato de buserelin (análogo de GnRH, Sincroforte, OuroFino Saúde Animal) e 24-26 horas depois os COCs foram coletados mediante aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). Os COCs foram coletados parcialmente desnudos e as células do cumulus congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior extração de RNA e análise de expressão gênica.

6.5.3 Análise de transcritos utilizando o sistema de microfluídica

As análises de expressão gênica de células do cumulus relacionadas a oócitos de diferentes qualidades foram feitas por microfluídica, sendo analisados 3 pools de cada grupo, NC (oócitos maturados *in vitro* que não clivaram), CNB (oócitos que clivaram mas interromperam seu desenvolvimento), BL (oócitos que desenvolveram até o estágio de blastocisto) e *In Vivo* (maturados *in vivo*). Os níveis de 96 transcritos foram avaliados utilizando o Biomark HD System (Fluidigm). A lista completa dos genes analisados está no apêndice D. Foram utilizados como endógenos os genes *PPIA*, *GAPDH* e *ACTB* e foi utilizada a média geométrica deles para os cálculos. A expressão gênica foi realizada utilizando ensaios TaqMan (20X, Applied Biosystems) específicos para *Bos taurus*. A pré-amplificação foi realizada com 1,25 µL de cDNA numa concentração de 5 ng/µL. A este cDNA foi adicionado 1,25 µL do mix do ensaio (A concentração final do ensaio TaqMan foi de 0.2X para cada 24 ensaios) e 2,5 µL TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) a 95°C por 10 min, 95°C por 15 seg, e 60°C por 4 min por 14 ciclos. Após ser diluído 5 vezes, os produtos das pré-amplificações foram analisados por PCR quantitativo a tempo real (Rt-qPCR) utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e ensaios TaqMan (20X, Applied Biosystems) no 96.96 Dynamic Array Integrated Fluidic Circuits em Biomark HD System (Fluidigm) usando o protocolo TaqMan GE 96 × 96 Standard, de acordo com as instruções do fabricante.

6.5.4 Análise estatística

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

7 RESULTADOS

7.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs, das células e das vesículas extracelulares, no microambiente do folículo ovariano bovino”

7.1.1 Caracterização das vesículas extracelulares

As VEs extraídas do meio de cultivo das GCs e dos COCs foram analisadas para demonstrar a eficiência do protocolo utilizado e para caracterizá-las. Primeiramente essas vesículas foram vistas e analisadas utilizando o equipamento NanoSight (Malvern), possibilitando conhecer o tamanho das vesículas isoladas e a concentração. As médias de tamanho das VEs isoladas variaram de 110 a 200nm e a moda variou de 75-140. Aparentemente as células da granulosa secretaram maior concentração (partículas/ml) de vesículas (Figura 10).

Figura 10 - Análise das vesículas extracelulares. Em A e B representação das médias e das modas, respectivamente, dos tamanhos vesiculares em cada vídeo analisado, os vídeos são provenientes de 3 amostras biológicas de cada grupo. Em C a média da concentração de vesículas (partículas/ml) de cada grupo.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **GC-VEs** - Vesículas extracelulares provenientes do meio de cultivo de células da granulosa. **COC-VEs** - Vesículas extracelulares provenientes do meio de cultivo de complexos cumulus-oócitos.

Também foram feitas análises para detecção da presença de proteínas marcadoras de vesículas extracelulares. Baseado no resultado do Western blotting é possível a confirmar a presença das proteínas ALIX e CD63 (Figura 11) nas VEs extraídas, as quais estão envolvidas na biogênese dos corpos multivesiculares e marcadoras de superfície de exossomos, respectivamente.

Figura 11 - Membranas de Western Blotting demonstrando a presença de proteínas marcadoras de exossomos nas vesículas extracelulares isoladas para o estudo 1.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **GC-VEs** - Vesículas extracelulares provenientes do meio de cultivo de células da granulosa. **COC-VEs** - Vesículas extracelulares provenientes do meio de cultivo de complexos cumulus-oócitos.

7.1.2 O perfil de microRNAs das células foliculares

As células da granulosa e os complexos cumulus-oócitos oriundos de folículos imaturos de 3 a 6 mm de diâmetro foram expostos *in vitro* ao hormônio folículo estimulante e utilizados para a determinação de perfis de expressão de miRNA. O painel de PCR em tempo real, customizado, utilizado na geração destes perfis continha 348 miRNAs bovinos maduros. Destes, um total de 326 miRNAs foram detectados, dos quais 302 foram detectados tanto na CGs quanto nos COCs (Apêndice E). Entre estes 302 miRNAs, apenas um estava aumentado nas GCs, o *miR-454* ($p=0,038$) e 10 estavam aumentados nos COCs: *let7a-3p* ($p=0,029$), *miR-128* ($p=0,050$), *miR-15b* ($p=0,027$), *miR-196b* ($p=0,008$), *miR-342* ($p=0,036$), *miR-411a* ($p=0,046$), *miR-497* ($p=0,036$), *miR-502b* ($p=0,035$), *miR-542-5p* ($p=0,005$), and *miR-592* ($p=0,010$) (Figura 12).

Figura 12 - Níveis relativos dos miRNAs diferencialmente expressos entre as células da granulosa (GC) e os complexos cumulus-oócitos (COC).

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **A-J**. MiRNAs que tiveram maior expressão nos COCs. **K**. MiRNA que teve menor expressão nos COCs. Barras representam os valores médios dos grupos e as barras de erro representam o desvio padrão. As letras indicam diferença estatística (p < 0,05).

Adicionalmente, miRNA exclusivos foram identificados nas CGs e COCs, sendo que 8 dos 326 miRNAs foram amplificados exclusivamente nas CGs e 16 miRNAs exclusivamente nas COCs (Tabela 1, Figura 13A).

Tabela 1 – MicroRNAs exclusivos identificados em células da granulosa (GCs) e complexos cumulus-oócitos (COCs) bovinos. Os valores de Ct representam a média do grupo.

Grupos de Células	miRNA	Valor de Ct	miRNA	Valor de Ct
CG	bta-miR-367	35.43	bta-miR-543	34.69
	bta-miR-449a	33.13	bta-miR-653	35.33
	bta-miR-451	28.47	bta-miR-759	35.18
	bta-miR-539	35.43	bta-miR-875	36.60
COC	bta-miR-105a	30.58	bta-miR-329b	35.32
	bta-miR-126-3p	30.35	bta-miR-365-5p	30.41
	bta-miR-137	35.15	bta-miR-369-5p	31.30
	bta-miR-142-3p	34.70	bta-miR-371	34.57
	bta-miR-200a	35.04	bta-miR-374b	28.44
	bta-miR-218	35.96	bta-miR-495	35.89
	bta-miR-219-5p	35.83	bta-miR-544b	32.18
	bta-miR-329a	36.06	bta-miR-562	33.65

Fonte: Própria autoria.

Figura 13 - Diagrama de Venn mostrando a disposição dos miRNAs identificados nas GCs e COCs (A) e nas vesículas extracelulares (VEs) das GCs e das COCs (B).

Fonte: Autoria Própria.

Legenda: GC – células da granulosa; COC – complexos cumulus-oócitos; GC-VE – vesículas extracelulares do meio de cultivo das células da granulosa; COC-VE – vesículas extracelulares do meio de cultivo dos complexos cumulus-oócitos.

7.1.3 O perfil de microRNAs das vesículas extracelulares do meio de cultivo condicionado

Vesículas extracelulares recuperadas do meio de cultivo de CGs e COCs foram utilizadas para extração de RNA e subsequente amplificação de 348 miRNAs bovinos maduros por PCR em tempo real. A análise por tempo real resultou em 67 miRNAs detectáveis (<37 Ct, em ao menos 2 de 3 amostras do grupo). Todos estes 67 miRNAs estavam expressos tanto nas CGs como nas COCs, ou seja, derivam dos 302 miRNAs comuns entre esses dois grupos. Destes 67 miRNAs, 24 foram comuns aos dois grupos de VEs de células foliculares (Apêndice F). Destes 24 miRNAs, dois (*miR-127* e *miR-433*, $p=0,035$ e $p=0,047$, respectivamente) foram

superiores no grupo GC-VE; e outros dois (*miR-631* e *miR-323*, $p=0,033$ e $p=0,023$, respectivamente) superiores no grupo COC-VE (Figura 14).

Figura 14 - Níveis relativos dos miRNAs diferentemente expressos entre as vesículas extracelulares derivadas das células da granulosa e dos complexos cumulus-oócitos (GC-VEs e COC-VEs, respectivamente). **A** e **C**. MicroRNAs cuja expressão está aumentada nas GC-VEs. **C** e **D**. MicroRNAs cuja expressão está elevada nas COC-VEs. Barras representam os valores médios dos grupos e as barras de erro representam o desvio padrão. As letras indicam diferença estatística ($p<0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Adicionalmente, assinaturas de miRNAs (miRNAs exclusivos) foram identificadas nas GC-VEs (12 miRNAs) e nas COC-VEs (30 miRNAs), os quais estão listados na tabela 2 (Figura 13B).

Tabela 2 – MicroRNAs exclusivos identificados em vesículas extracelulares derivadas das células da granulosa (GC-VEs) e complexos cumulus-oócitos (COC-VEs) bovinos.

Grupos de VEs	miRNA	Valor de Ct	miRNA	Valor de Ct
CG-VEs	bta-miR-125b	34.84	bta-miR-27a-5p	27.27
	bta-miR-130b	34.92	bta-miR-29d-5p	34.36
	bta-miR-132	36.45	bta-miR-370	35.66
	bta-miR-143	34.95	bta-miR-502b	36.14
	bta-miR-154b	34.08	bta-miR-760-3p	33.40
	bta-miR-155	35.06	bta-miR-885	34.97
	bta-miR-197	34.26		

COC-VEs	bta-let-7e	32.83	bta-miR-16b	33.10
	bta-let-7f	34.45	bta-miR-187	34.26
	bta-let-7i	34.61	bta-miR-210	33.86
	bta-miR-1	35.61	bta-miR-25	35.07
	bta-miR-100	34.27	bta-miR-26a	33.81
	bta-miR-101	35.30	bta-miR-30c	36.50
	bta-miR-106a	34.41	bta-miR-339b	35.12
	bta-miR-124b	34.84	bta-miR-346	33.54
	bta-miR-125a	34.18	bta-miR-378b	34.98
	bta-miR-129	34.66	bta-miR-425-3p	29.46
	bta-miR-133a	32.78	bta-miR-453	34.95
	bta-miR-145	33.29	bta-miR-665	31.20
	bta-miR-149-3p	30.64	bta-miR-874	33.87
	bta-miR-149-5p	33.14	bta-miR-877	32.88
	bta-miR-15a	33.60	bta-miR-940	28.43

Os valores de Ct representam a média do grupo. Fonte: Autoria Própria.

7.1.4 Análise de bioinformática dos microRNAs

As análises de bioinformática foram utilizadas como estratégia para identificar as vias reguladas pelos miRNAs identificados e, potencialmente envolvidas na aquisição de competência oocitária. Os miRNAs que foram exclusivos de cada tipo celular ou de suas respectivas VEs e os miRNAs que foram diferencialmente expressos entre os tipos celulares ou os tipos de vesículas extracelulares foram utilizados para determinar as vias moduladas. As análises de bioinformática dos miRNAs bovinos identificados foram feitas utilizando as sequências de miRNAs humanos, devido a alta homologia entre os miRNAs humanos e bovinos (Apêndice B), a alta homologia entre os miRNAs e as sequências 3'UTR do gene alvo, e também, a maior disponibilidade de informações e bancos de dados humanos.

Os miRNAs de cada uma das origens (CGs, COCs, CG-VEs e COC-VEs) foram agrupados e utilizados para identificar as vias reguladas utilizando o pacote de análise 'mirpath' disponível no DIANA tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools>). A análise dos 8 miRNAs exclusivamente detectados na células da granulosa indicou, de modo preditivo, a regulação de 69 vias celulares. De modo similar, os 16 miRNAs exclusivos das COCs indicaram 94 vias; os 13 miRNAs das CG-VEs indicaram 58 vias sendo reguladas; enquanto que os 30 miRNAs exclusivos das COC-VEs indicaram, de modo preditivo, a regulação de 102 vias. Dentre todas estas vias, as mais relevantes encontradas para as células e nas vesículas extracelulares estão apresentadas na Figura 15.

Figura 15 - Número de genes e fator de enriquecimento ($-\log_{10}$ (valor de p)) de vias mais relevantes preditamente reguladas por miRNAs encontrados exclusivamente em células da granulosa (CG), complexos cumulus-oócitos (COCs) e suas respectivas vesículas extracelulares (CG-VEs e COC-VEs).

Fonte: Própria autoria.

Com relação aos miRNAs que foram diferencialmente expressos entre os dois tipos celulares, o *miR-454* que teve expressão elevada nas GCs está envolvido na regulação de 19 vias do metabolismo celular, já os 10 miRNAs com os níveis de expressão aumentados nos COCs estão relacionados a 68 vias. Nas análises dos miRNAs que tiveram níveis de expressão diferentes entre as VEs, os miRNAs *miR-127* e *miR-433* aumentados nas GC-VEs estão envolvidos na regulação de 14 vias, já os *miR-631* e *miR-323* mais expressos nas COC-VEs tem função de regulação em 13 vias do metabolismo. Dentre todas estas vias, as mais relevantes encontradas para as células e nas vesículas extracelulares estão apresentadas na Figura 16.

Figura 16 - Número de genes e fator de enriquecimento ($-\log_{10}$ (valor de p)) de vias mais relevantes preditamente reguladas por miRNAs diferentemente expressos em células da granulosa (CGs), complexos cumulus-oócitos (COCs) e suas respectivas vesículas extracelulares (CG-VEs e COC-VEs).

Fonte: Própria autoria.

Diferentes genes foram preditos como regulados pelos miRNAs identificados exclusivamente em cada grupo celular ou em suas vesículas extracelulares. Em conjunto, estes genes representaram a modulação de diversas vias do metabolismo ou vias de sinalização, tais como a via de sinalização da PI3K-Akt. A via da PI3K-Akt destaca-se como sendo controlada por diferentes miRNAs de diferentes origens. Há 70 genes e 111 genes da via PI3K-Akt preditamente regulados pelos miRNAs exclusivos das CGs e COCs, respectivamente. De modo similar há 76 e 178 genes da via da PI3K-Akt preditamente regulados por miRNAs identificados exclusivamente nas CG-VEs e COC-VEs, respectivamente; o que sugere alta relevância desta via de sinalização dentro do ambiente folicular. Uma vez que estes

Figura 18 - Representação das comparações dos perfis de miRNAs das células foliculares, células da granulosa (GCs) e complexos cumulus-oócitos (COCs) e suas vesículas extracelulares, GC-VEs e COC-VEs respectivamente. Em **A** gráfico PLSDA mostrando a separação dos grupos, sendo GCs em roxo, COCs em vermelho, GC-VEs azul claro e COC-VEs em verde. Em **B** diagrama de venn mostrando a co-expressão dos miRNAs nos grupos experimentais, sendo GCs em roxo, COCs em amarelo, GC-VEs em verde e COC-VEs em vermelho.

Fonte: Própria autoria.

Para compreender melhor a contribuição de cada tipo celular no perfil de miRNA das vesículas extracelulares do fluido folicular foi feita uma análise do perfil de miRNAs nas VEs do fluido folicular de forma semelhante ao RT-PCR feito nos outros componentes foliculares. As VEs isoladas do FF pelo mesmo protocolo de centrifugações seriadas e ultracentrifugações. Foram detectados 196 miRNAs (Ct < 37) que estão identificados no apêndice G, dos quais 61 também foram expressos pelas VEs recuperadas do meio de cultivo das células foliculares. Interessantemente, 6 miRNAs identificados nas VEs provenientes das células foliculares não foram encontrados nas FF-VEs. A lista completa comparando os miRNAs identificados nas GCs, COCs, GC-VEs, COC-VEs e nas FF-VEs miRNAs no apêndice H. Interessantemente, todos os miRNAs do perfil das FF-EVs foram detectados em outros componente do ambiente folicular analisado (Figura 19).

Figura 19 - Diagrama de venn demonstrando os miRNAs compartilhados e não compartilhados entre os componentes do ambiente folicular analisados.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Células da granulosa (GCs) representado em azul, complexo cumulus-oócito (COCs) em marrom, vesículas extracelulares das células da granulosa (GC-VEs) em vermelho, vesículas extracelulares dos complexos cumulus-oócitos (COC-VEs) em amarelo e vesículas extracelulares do fluido folicular (FF-VEs) em verde.

7.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”

7.2.1 Taxas de produção dos embriões partenotos individuais

Com base nos achados da análise de bioinformática provenientes do estudo 1, decidiu-se investigar se a via da PI3K-AKT estava associada à competência oocitária. Para tal, os níveis de componentes da via PI3K-Akt em células foliculares de folículos ovarianos contendo oócitos com diferentes níveis de competência ao desenvolvimento até a fase de blastocisto foram investigados. Os oócitos foram individualmente manipulados para fins de maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. Após a verificação da maturação nuclear (presença ou ausência do corpúsculo polar) todos os oócitos foram ativados partenogeneticamente e cultivados, de modo a prevenir que oócitos maduros fossem classificados como não-maduros. No dia 3 e no dia 7 após a ativação partenogenética os embriões foram avaliados e as células foliculares (CFs) previamente estocadas foram agrupadas de acordo com a competência ao desenvolvimento do oócito nos seguintes grupos: Não-Clivado (NC), Clivado-Não-Blastocisto (CNB) e Blastocisto (BL). As CFs destes três grupos, recuperadas no momento da dissecação folicular, foram utilizadas para

determinar níveis de RNA, mensageiro e pequenos RNAs, e de proteínas dos componentes da via PI3K-Akt, em um modelo retrospectivo de análise da competência ao desenvolvimento. Um total de 174 oócitos foram coletados após dissecação, maturados e ativados individualmente. Destes, 63,79% clivaram e 29,31% atingiram a fase de blastocisto. Apenas rotinas com uma taxa de blastocisto/clivados superior a 35% foram utilizadas nos experimentos seguintes (Tabela 3).

Tabela 3 – Rotinas de desenvolvimento partenogenético individual de embriões bovinos. Apenas rotinas com taxa igual ou superior a 35% de Blastocisto/Clivado foram utilizadas.

Rotina	Oócitos (total)	Clivados (total)	Clivados (%)	Blastocistos (total)	Blastocistos (% oócitos)	Blastocistos (% clivado)
1	16	10	62.50	6	37.50	60.00
2	16	9	56.25	5	31.25	55.56
4	19	11	57.89	5	26.32	45.45
6	21	15	71.43	7	33.33	46.67
7	18	11	61.11	4	22.22	36.36
8	22	16	72.73	8	36.36	50.00
9	23	17	73.91	7	30.43	41.18
10	17	11	64.71	5	29.41	45.45
11	22	11	50.00	4	18.18	36.36
TOTAL	174	111	63.79	51	29.31	45.95

Fonte: Própria autoria.

7.2.2 Análises dos transcritos *PTEN*, *PI3K* e proteína *pAkt* nas células foliculares relacionadas à qualidade oocitária

Como os miRNAs presentes nas CGs, COCs e em suas vesículas extracelulares modulam diferentes genes da via PI3K-Akt, decidiu-se investigar os níveis de RNA mensageiro e de proteínas dos principais componentes dessa via de sinalização. Os níveis de mRNA do *PTEN* (inibidor da Akt) e da *PI3K* (ativador da Akt) foram determinados em células foliculares dos grupos NC, CNB e BL. Os níveis de expressão relativa do *PTEN* nas células foliculares foi significativamente menor ($p < 0,05$) nas CFs do grupo BL quando comparado aos grupos cujos oócitos foram incapazes de gerar blastocisto (NC e CNB; Figura 19). O *PTEN* catalisa a conversão do PIP3 em PIP2 e mantém baixo os níveis de PIP3, um ativador da Akt. Os níveis de *PI3K*, embora numericamente superiores no CNB e BL, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre grupos associados à competência oocitária (Figura 20). O *PI3K* faz a conversão do PIP2 em PIP3, e portanto, é um

ativador da via PI3K-Akt.

Figura 20 - Expressão relativa de (A) *PTEN* e (B) *PI3K* em células foliculares de acordo com os grupos oocitários de competência. Não-Clivado (NC), Clivado-Não-Blastocisto (CNB) e Blastocisto (BL). Barras indicam a média e barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Os níveis de PTEN e PI3K, modulam os níveis de PIP2 e PIP3, e regulam a ativação da Akt. De modo a verificar se a via de sinalização PI3K-Akt estava sendo diferencialmente ativada de acordo com a competência do oócito, foi avaliado os níveis proteicos da forma fosforilada da proteína Akt (p-Akt) nas células foliculares dos grupos NC, CNB, BL. As análises de Western blot permitiram determinar que, dentre aqueles que iniciam o desenvolvimento embrionário, maiores ($p < 0,06$) níveis da p-Akt estão presentes em CFs de folículos que produziram blastocistos (Figura 21)

Figura 21 - Níveis da proteína fosforilada Akt (p-Akt) em células foliculares dos grupos de competência oocitária Não-Clivado (NC), Clivado-Não-Blastocisto (CNB) e Blastocisto (BL). A) Valores normalizados de p-Akt obtidos por Western Blotting. B) Bandas proteicas representativas de p-Akt (~60 kDa) e de Actina-B (ACTB; 42 kDa) geradas por Western Blotting. Barras indicam a médias e barras de erros indicam o erro padrão da média.

Fonte: Própria autoria.

7.2.3 Análise dos miRNAs, *miR494* e cluster *miR17-92*, nas células foliculares relacionadas à qualidade oocitária

O *bta-miR-494* é um regulador validado do PTEN em humanos (LIU et al.,

2010), e apresenta sítios de ligação conservado entre as espécies mamíferas, incluindo os bovinos, de acordo com o programa TargetScan (<http://www.targetscan.org/>). Os níveis de expressão relativa do bta-miR-494 foram superiores ($p<0,05$) em CFs de folículos cujos oócitos conseguiram clivar (CNB) ou chegar até blastocisto (BL) comparado àqueles que não clivaram (NC; Figura 21).

Para validar a interação do *miR-494* com a extremidade 3'UTR do seu gene alvo *PTEN*, em bovinos, foi feito o ensaio de luciferase. Os resultados indicaram que células da granulosa, com o vetor com a sequência selvagem da região 3'UTR do gene *PTEN* diminuiu a intensidade de luz da atividade da luciferase após a transfecção do mimetizador do *miR-494* quando comparadas ao controle e as células com a construção mutante da região 3'UTR do gene alvo, sugerindo que o *miR-494* é um regulador do *PTEN*, também em bovinos (Figura 22).

Figura 22 - Em **A** Expressão relativa por RT-qPCR do bta-miR-494 em células foliculares dos grupos de competência oocitária Não-Clivado (NC), Clivado-Não-Blastocisto (CNB) e Blastocisto (BL). Barras indicam a média e barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam significância estatística ($p<0,05$). Abaixo os sítios de interação entre o microRNA-494 bovino e a região 3'UTR do gene *PTEN*. Análises *in silico* indicam a existência de dois sítios de interação na região 3'UTR do *PTEN* conservados entre mamíferos. Em **B** ensaio de luciferase da sequência 3'UTR *PTEN* do bovino nas células da granulosa. A atividade da luciferase foi avaliada nas células transfectadas com o vetor pmirGLO controle, com o vetor com a sequência selvagem e com o vetor contruído com a sequência mutante e foram avaliados após a transfecção do mimetizador do *bta-miR-494*. As letras diferentes indicam $p<0,05$ e ** indicam $p<0,01$.

Fonte: Própria autoria.

Adicionalmente, também avaliamos a expressão relativa de miRNAs do cluster *miR-17-92*, do qual alguns miRNAs foram validados, em células da granulosa de

bovinos, como reguladores do gene *PTEN* (ANDREAS et al., 2016). Nesse estudo, foram avaliados os níveis de expressão do *miR-17-5p*, *miR-17-3p*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-19b*, *miR-20a*, *miR-92a* e *miR-92b* em CFs de folículos cujos oócitos não clivaram (NC), conseguiram clivar (CNB) ou chegar até blastocisto (BL) (Figura 23). Três miRNAs do cluster tiveram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos, o *miR-19b*, o *miR-20a* e o *miR-92b*, interessante todos aumentados no grupo de células foliculares cujos oócitos chegaram ao estágio de blastocisto, ou seja, em CFs de oócitos de maior qualidade. Entre esses três miRNAs apenas o *miR-20a* tem sua interação com o *PTEN* validada em bovinos (ANDREAS et al., 2016).

Figura 23 - Expressão relativa dos miRNAs em células foliculares de acordo com os grupos oocitários de competência. Não-Clivado (NC), Clivado-Não-Blastocisto (CNB) e Blastocisto (BL). Barras indicam a média e barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

7.2.4 Análises de genes regulados pela via de sinalização PI3K-Akt nas células foliculares relacionadas à qualidade oocitária

A via de sinalização da PI3K-Akt regula diferentes processos celulares, como por exemplo: a síntese proteica, o reparo de DNA, a proliferação celular e a apoptose, entre outros. Visando identificar mecanismos pelos quais a via da PI3K-Akt modula a competência oocitária a expressão de genes regulados pela PI3K-Akt foi avaliada. Os níveis de RNA mensageiro de 8 genes (*BAX*, *BCL-2*, *BRCA*, *CDK6*, *EIF4b*, *EIF4e*, *FOXO3a* e *YWHAZ*) em células foliculares de oócitos com diferente capacidade de desenvolvimento foi determinado (Figura 24). Destes genes, apenas *BAX* e *FOXO3a* apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos de competência. A expressão de *BAX* foi superior ($p < 0,05$) no grupo blastocisto, embora a razão *BAX/BCL-2* não tenha variado entre grupos. De modo similar, a expressão de *FOXO3a* foi superior ($p < 0,05$) nos grupos CNB e BL comparado ao NC, sugerindo resposta de proliferação celular FOXO3a-dependente.

Figura 24 - Expressão relativa de genes da via PI3K-AKT RT-PCR associados às respostas celulares finais. Valores de expressão obtidos em células foliculares dos grupos de competência oocitária Não-Clivado (NC), Clivado-Não-Blastocisto (CNB) e Blastocisto (BL). Barras indicam a média e barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes (a, b) indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

7.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”

7.3.1 Perfil de mRNAs nas células do cumulus relacionado à competência do oócito ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto

Nas análises de sequenciamento de RNA total foram avaliados os transcritos presentes referentes à qualidade oocitária nas células do cumulus de oócitos que maturaram mas não clivaram (**NC**), células do cumulus de oócitos que clivaram mas interromperam seu desenvolvimento antes do estágio de blastocisto (**CNB**) e células do cumulus de oócitos que chegaram até o estágio de blastocisto (**BL**). De um total de 10382 genes, apenas 1 gene estava menos expresso no NC comparado ao CNB, o *MT2A*, metalotioneína 2A. Nas análises entre os grupos extremos, NC e BL, 983 genes estavam diferentemente expressos, sendo 702 com maiores níveis de expressão no grupo NC e 281 com maior expressão no grupo BL. Com relação aos grupos CNB e BL, 190 transcritos apresentaram níveis de expressão diferentes, sendo 159 mais expresso no grupo CNB e 31 mais expressos no grupo BL. A lista completa desses genes encontra-se no apêndice I. Conforme esperado, os grupos extremos apresentaram maiores diferenças no perfil de mRNAs (Figura 25).

Figura 25 - Volcano plots representando os genes diferentemente expressos entre os grupos experimentais. Em vermelho são mais expressos no primeiro elemento do contraste, genes em verde são mais expressos no segundo elemento.

Fonte: Própria autoria.

Nas análises de enriquecimento funcional, 6 vias metabólicas estavam menos ativas nas células do cumulus do grupo NC quando comparadas às células do grupo BL, sendo elas via dos ribossomos, via do metabolismo do ácido 2-oxocarboxílico, via do metabolismo de manose e frutose, via da tiamina, metabolismo de galactose e metabolismo de carbono. Quando comparadas as células do cumulus do grupo

CNB vs BL, observou-se 1 via mais ativa no grupo CNB a via de interação do receptor matriz extracelular (ECM) e 5 vias menos ativas no grupo CNB sendo elas via dos ribossomos, metabolismo de manose e frutose, via da pentose fosfato, metabolismo da tiamina e via do metabolismo do ácido 2-oxocarboxílico (Figura 26).

Figura 26 - Gráficos representando o Log do *fold change* (FC) e valor de p ($-\log_{10}$) das vias KEGG diferentes nas comparações entre células do cumulus diferentes grupos de qualidade NC, CNB e BL.

Fonte: Própria autoria.

Nas análises de ontologia gênica, entre os grupos NC e BL e os grupos CNB e BL, a maioria das funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares estão mais ativas nas células do cumulus dos oócitos de melhor qualidade BL. Através das 10 categorias com menor valor de p entre os grupos NC x BL, representadas na figura 27, observa-se uma maior ativação de funções ligadas aos ribossomos e consequentemente atividade traducional nas células do cumulus associadas aos oócitos de melhor qualidade.

Figura 27 - Representação gráfica do resultado ontologia gênica. Mostrando as 10 funções mais alteradas dentro de cada categoria entre os grupos NC e BL.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: As barras representam o valor de p ajustado ($-\log^{10}$). O asterisco (*) indica a única função alterada que está mais ativa no grupo não clivados (NC).

Os genes mais expressos no grupo de melhor qualidade estão relacionados a diferentes funções como transporte de moléculas, comunicação celular, ciclo celular, diferenciação, desenvolvimento, apoptose, resposta ao estresse. Todas estas vias são funções fundamentais para o desenvolvimento oocitário e embrionário inicial (Figura 28). De forma a compreender melhor os genes e vias relacionadas ao processo de aquisição de qualidade oocitária, foram escolhidos 10 genes, mais expressos no grupo BL quando comparados com o grupo NC com

maior diferença de expressão ($> fold\ change$). Os genes que apresentavam maior diferença são: *FOXL2*, *IGF2*, *FIZ1*, *CDC25B*, *CDCA3*, *GLIS2*, *ABLIM3*, *PRKCDBP*, *USE1* e *ZNF444*. Esses genes, quando agrupados, atuam principalmente na via da insulina/IGF tanto por ativação da cascata MAPK quanto por ativação da cascata por proteína quinase B. A lista completa dos genes associados à qualidade, quando comparados os grupos NC e BL está no apêndice J.

Figura 28 - Ontologia gênica dos genes mais expressos no grupo blastocisto (BL) comparados ao grupo não-clivados (NC) destacando algumas funções celulares importantes durante o desenvolvimento oocitário/embrionário inicial.

Fonte: Própria autoria.

7.3.2 Análise de miRNAs nas células do cumulus relacionado à competência do oócito ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto

Foram analisados 383 microRNAs, incluindo os 3 endógenos. No total 309 miRNAs foram identificados em pelo menos um grupo experimental, sendo 222 miRNAs comuns em todos os grupos, 19 exclusivos no grupo NC, 21 no grupo CNB e 15 no grupo de BL (Figura 29 e Quadro 3).

Figura 29 - Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos miRNAs identificados nas células do cumulus relacionadas aos oócitos com diferentes capacidade ao desenvolvimento.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **NC** – células do cumulus de oócitos que não clivaram após a ativação partenogenética, **CNB** – células do cumulus de oócitos que clivaram mas não chegaram ao estágio de blastocisto e **BL** – células do cumulus de oócitos que chegaram ao estágio de blastocisto.

Quadro 3 – Lista dos miRNAs detectados exclusivamente nos diferentes grupos de células do cumulus analisados: NC, CNB e BL.

miRNAs exclusivos		
NC	CNB	BL
bta-miR-124b	bta-miR-105b	bta-miR-188
bta-miR-133a	bta-miR-122	bta-miR-200c
bta-miR-142-5p	bta-miR-124a	bta-miR-21-5p
bta-miR-146b	bta-miR-154b	bta-miR-212
bta-miR-222	bta-miR-194	bta-miR-216a
bta-miR-301a	bta-miR-33b	bta-miR-219-5p
bta-miR-301b	bta-miR-345-3p	bta-miR-365-5p
bta-miR-302d	bta-miR-361	bta-miR-376b
bta-miR-331-5p	bta-miR-376c	bta-miR-382
bta-miR-371	bta-miR-411c-3p	bta-miR-376d
bta-miR-34c	bta-miR-411c-5p	bta-miR-380-3p
bta-miR-409a	bta-miR-381	bta-miR-424-3p
bta-miR-380-5p	bta-miR-487b	bta-miR-539
bta-miR-452	bta-miR-543	bta-miR-665
bta-miR-431	bta-miR-544a	bta-miR-1296
bta-miR-503-3p	bta-miR-551a	
bta-miR-495	bta-miR-764	
bta-miR-562	bta-miR-769	
bta-miR-760-3p	bta-miR-1193	
	bta-miR-1301	
	bta-miR-1284	

Fonte: Própria autoria.

O resultado da análise utilizando o software online miRNet (FAN et al., 2016) mostra que miRNAs formam redes de interações de forma a regularem vias celulares em conjunto (Figura 30). Os miRNAs exclusivos dos grupos NC, CNB e BL são preditos por regularem 67, 52 e 30 vias celulares, respectivamente, incluindo diversas vias de sinalização, via da meiose oocitária, via de transporte de RNA, via de endocitose, adesões focais, junções gap e algumas vias de metabolismo. A lista completa das vias preditas por serem reguladas pelos miRNAs exclusivos para cada grupo está no apêndice J.

Figura 30 - Representação da rede de interação entre os miRNAs exclusivos no grupo de células do cumulus associadas a oócitos que desenvolveram até o estágio de blastocisto BL.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados de análises multivariadas indicaram diferenças entre os grupos e uma grande similaridade das amostras dentro do mesmo grupo (Figura 31). Nas análises estatísticas 16 miRNAs foram diferentemente expressos entre os grupos experimentais. Dentre eles, três miRNAs, miR-130b, miR-135b e miR-449b estavam mais expressos nas células do cumulus relacionadas aos oócitos de melhor

qualidade (BL) e outros três miRNAs, miR-449a, miR-223 e miR-296-5p, foram menos expressos no grupo BL quando comparados aos outros sendo associados a incapacidade de chegar ao estágio de blastocisto (Figura 32). Sendo os três primeiros preditos por regularem vias importantes entre elas sinalização TGF-beta, junções gap, endocitose, sinalização ErbB, junções aderentes e meiose oocitária; e os três últimos preditos por regularem, principalmente, vias de sinalização como MAPK, TGF-beta, p53, PI3K-Akt, cálcio e Notch. Os níveis de expressão dos outros 10 miRNAs estavam aumentados ou diminuídos no grupo intermediário de qualidade, o grupo **CNB**, e semelhantes entre os grupos extremos, **NC** e **BL**.

Figura 31 - Análise de componentes principais (A) e análise de correlação das amostras (B) representando a separação das amostras dos diferentes grupos e a similaridade das amostras de um mesmo grupo. Nas figuras vermelho representa o grupo BL, verde o grupo CNB e em azul o grupo NC.

Fonte: Própria autoria.

Figura 32 - Expressão relativa dos miRNAs diferentes estatisticamente entre os grupos experimentais. Diferentes letras nos gráficos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). As barras correspondem as médias do grupo e as barras de erro ao erro padrão da média.

Fonte: Própria autoria.

7.3.3 Relação de expressão entre os microRNAs e RNAs mensageiros alvos

Ao comparar o perfil de expressão de RNAs mensageiros com o perfil de expressão de miRNAs, encontra-se em alguns genes a relação de regulação. Na tabela abaixo estão representados os miRNAs diferentemente expressos entre os grupos experimentais que possuem algum dos genes alvos, fortemente validados, e apresentam diferentemente expressos nas análises de RNAseq (Quadro 4). Essa tabela demonstra que alguns miRNAs possuem relação inversa com seus genes alvos sugerindo uma possível regulação pós-transcricional.

Quadro 4 – Relação dos miRNAs diferentemente expressos entre os grupos de qualidade com alvos (mRNAs) fortemente validados também diferentemente expressos entre os grupos.

miRNAs	Grupo de maior expressão do miRNA	Gene alvo	Grupo de maior expressão do gene alvo	Relação
miR-135b	BL	SMAD5	NC, CNB	Inversa
		BMPR2	NC, CNB	Inversa
		APC	NC	Inversa
		TGFBR1	CNB	Inversa
miR-130b	BL	TP53INP1	NC	Inversa
		ITGB1	NC	Inversa
miR-449b	BL	SIRT1	NC, CNB	Inversa
miR-223	NC	ARID4B	NC, CNB	Direta
		ATM	NC	Direta
		MSMO1	NC	Direta
		NAMPT	NC	Direta
		TWF1	NC	Direta
miR-449a	NC	SIRT1	NC, CNB	Direta
miR-218	CNB	BIRC6	NC, CNB	Direta
		STAM2	NC	Inversa
		GJA1	NC	Inversa
		RICTOR	NC, CNB	Direta
		BMI1	NC	Inversa

Fonte: Própria autoria.

7.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”

Os 96 genes analisados no estudo 4 pertenciam a um painel de genes de interesse nas células do cumulus de grupos de pesquisa parceiros. Os níveis de expressão dos transcritos foram avaliados em quatro grupos de células do cumulus, sendo: células do cumulus de COCs maturados *in vivo*, e células do cumulus de COCs maturados *in vitro* correspondentes aos três grupos de competência (NC, CNB e BL). A lista completa dos genes identificados, com as médias e desvio padrão, está no apêndice K.

Comparando apenas os sistemas de maturação *in vitro* com o *in vivo*, treze genes apresentaram diferenças estatísticas. Dentre os genes relacionados à síntese e metabolismo proteico, os genes *HPRT1*, *LUM* e *NPR2* estavam alterados, sendo os dois primeiros mais expressos nas células do cumulus maturadas *in vitro* e o último mais expresso no grupo *in vivo*. O gene anti-apoptótico *IGF1R*, foi mais expresso nos grupos *in vitro* do que no grupo *in vivo*. Os genes relacionados a resposta ao estresse oxidativo e ao estresse do retículo endoplasmático *CAT*, *NOS2*

e *SOD1* estavam mais expressos nos grupos *in vitro* e os genes *BDNF* e *GPX1* elevados no grupo *in vivo*. Dois transcritos relacionados ao remodelamento epigenético (*H2AFZ*, *HDAC2*) e um de atividade mitocondrial (*FDX1*) apresentavam com níveis de expressão superiores nas células do cumulus *in vitro*. Por fim, o gene *DICER1*, responsável por clivar precursores de miRNAs em miRNAs maduros foi mais expresso no grupo *in vivo* (Figura 33). Demonstrando que a maturação *in vitro* leva a alterações no padrão de expressão de transcritos importantes.

Figura 33 - Expressão dos genes diferentes entre os grupos de células do cumulus *in vitro* e o grupo *in vivo*. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **NC** – células do cumulus de oócitos que maturaram *in vitro* mas não clivaram após a ativação partenogenética, **CNB** – células do cumulus de oócitos que clivaram mas não chegaram ao estágio de blastocisto, **BL** – células do cumulus de oócitos que chegaram ao estágio de blastocisto, **In Vivo** - células do cumulus de oócitos que maturaram *in vivo*.

Ao comparar apenas os grupos *in vitro*, desconsiderando o grupo *in vivo*, 9 genes tiveram diferenças de expressão entre os grupos de qualidade oocitária foram identificadas. Os genes *CASP3*, *GPX4*, *SOD1*, *GREM1*, *IMPDH1*, *IMPDH2*, *PLIN3*, e *H3FA3* estão menos expressos no grupo BL quando comparado ao grupo NC. Com

relação ao gene *DNMT1*, o grupo CNB tem menor expressão quando comparado ao NC. Sendo, portanto, todos eles relacionados à qualidade oocitária ou, ao menos, para iniciar o desenvolvimento embrionário inicial.

Por fim, nota-se nos transcrito alterados entre os grupos *in vitro*, que na maioria dos transcritos, com exceção aos relacionados à resposta ao estresse oxidativo e do retículo endoplasmático (RE), o padrão de expressão entre o grupo *in vivo* assemelha-se ao grupo de células do cumulus correspondente aos oócitos de melhor qualidade *in vitro*, os grupos CNB e BL, ou somente com o BL. O que sugere que quando as células do cumulus são menos alteradas pelo sistema *in vitro* o oócito apresenta maior competência para desenvolver até o estágio de blastocisto (Figura 34).

Figura 34 - Expressão dos genes diferentes entre os grupos de células do cumulus de diferentes capacidades ao desenvolvimento. Diferentes letras dentro do mesmo gráfico indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). As barras correspondem às médias e as barras de erro ao erro padrão da média.

Fonte: Própria autoria.

Legenda: **NC** – células do cumulus de oócitos que maturaram *in vitro* mas não clivaram após a ativação partenogenética, **CNB** – células do cumulus de oócitos que clivaram mas não chegaram ao estágio de blastocisto, **BL** – células do cumulus de oócitos que chegaram ao estágio de blastocisto, **In Vivo** - células do cumulus de oócitos que maturaram *in vivo*.

8 DISCUSSÃO

8.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs, das células e das vesículas extracelulares, no microambiente do folículo ovariano bovino”

No presente estudo, foram avaliados os níveis de expressão de 348 miRNAs nas células foliculares (GCs e COCs) e também nas vesículas extracelulares (VEs) liberadas por essas células durante o cultivo. Inicialmente nós caracterizamos os diferentes perfis de miRNAs de ambos tipos celulares e suas VEs e, apesar das variações individuais na expressão dos miRNAs, os miRNAs identificados são preditos de regularem vias em comum, muitas vezes associadas com o desenvolvimento oocitário e folicular. Por fim, para compreender melhor a contribuição de cada tipo celular no perfil de miRNA das vesículas extracelulares do fluido folicular, foram comparados os perfis de miRNA das células, das VEs derivadas do meio de cultivo das células foliculares e das VEs do fluido folicular (FF-VEs).

Foram observados que entre as GCs e os COCs 11 miRNAs foram diferentemente expressos. Dentre esses miRNAs, o *miR-15b*, estava elevado nos COCs em relação as GCs. O *miR-15b* foi fortemente validados em estudos anteriores em bovinos de acordo com o programa miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) e foi relatado como sendo negativamente regulado pelo FSH em células da granulosa de equinos (YAO et al., 2009). Nesse experimento, do estudo 1, os dois tipos celulares GCs e COCs foram expostos ao FSH durante o cultivo *in vitro*, no entanto, o aumento na expressão do *miR-15b* sugere que as GCs responderam de maneira mais intensa ao FSH.

Outros miRNAs que tiveram sua expressão aumentada nos COCs foram o *miR-342* e o *miR-542-5p*, ambos descritos recentemente em VEs do líquido folicular de bovinos sendo mais expressos em folículos maiores (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016). De maneira similar, o *let-7a-3p* e o *miR-542-5p* cuja expressão neste estudo também estava aumentada nos COCs quando comparados com as GCs, foram previamente descritos como sendo menos e mais expressos nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios quando comparados aos folículos subordinados, respectivamente (GEBREMEDHN et al., 2015). Juntos, estes resultados sugerem que o o *let-7a-3p* e o *miR-542-5p* provavelmente têm um papel diferente nos COCs independente do estágio folicular.

Ainda, neste estudo, vários miRNAs foram identificados como específicos de cada tipo celular, podendo ser considerados como possíveis assinaturas das GCs e

dos COCs e, alguns destes miRNAs tem papel regulatório em vias de sinalizações importantes durante o desenvolvimento folicular como PI3K-Akt, Wnt e MAPK. Dentre os miRNAs específicos das GCs o *miR-449a* (YAO et al., 2015) e o *miR-451* (TIAN et al., 2012; LI et al., 2013) foram descritos como associados com a via de sinalização PI3K-Akt, sendo o primeiro recentemente descrito como associado a via de sinalização Wnt (NOFERESTI et al., 2015).

Com relação aos miRNAs exclusivos dos COCs, o *miR-105* (SHEN et al., 2014), o *miR-126* (KIM et al., 2014) e o *miR-200a* (BECKER et al., 2015) foram, em estudos prévios, descritos associados a via de sinalização PI3K-Akt e os miRNAs, *miR-128* e *miR-219-5p*, possuem função de regulação na via de sinalização Wnt (HU et al., 2017; LI et al., 2017) e o *miR-126* foi relatado como associado com a via de sinalização MAPK (CHAKRABORTY et al., 2016). Essas vias de sinalização (PI3K-Akt, Wnt e MAPK) já foram relatadas sendo reguladas por miRNAs e associadas ao desenvolvimento folicular em células da teca e em células da granulosa (ZIELAK-STECIWKO et al., 2014). Contudo, os resultados deste estudo sugerem que os perfis de miRNAs das células foliculares são específicos de cada tipo celular e estão relacionados na regulação de vias de sinalização, do metabolismo e também vias que controlam as funções das junções as quais são extremamente importantes para o adequado desenvolvimento do folículo.

Nas vesículas extracelulares liberadas no meio de cultivo pelas células foliculares (GC-VEs e COC-VEs) foram identificados quatro miRNAs que foram diferentemente expressos. Sendo, o *miR-127* e o *miR-433* mais expresso nas GC-VEs, enquanto que o *miR-323* e o *miR-631* foram mais expressos nas COC-VEs. O *miR-127* já foi descrito em VEs do soro sanguíneo de bovinos, sendo mais expresso no dia 7 do ciclo estral (NOFERESTI et al., 2015); o *miR-433* já foi descrito em VEs do fluido folicular de éguas e teve maior expressão em animais mais jovens (DA SILVEIRA et al., 2012). O *miR-323* também já foi identificado em vesículas extracelulares de fluido folicular, mas de humanos, foi associado produção a embriões de alta qualidade (FENG et al., 2015). Por fim, o *miR-631* foi descrito, recentemente, como abundante no fluido folicular de bovinos, mostrando-se muito elevado em embriões de 4 células que passaram por suplementação de VEs de fluido folicular de folículos de 3 a 6mm de diâmetro durante o seu desenvolvimento (DA SILVEIRA et al., 2017).

Nesse estudo das VEs das células foliculares, também houveram miRNAs que foram exclusivos de cada tipo de vesícula extracelular. No total nas GC-VEs foram identificados 13 miRNAs que não foram detectados nas COC-VEs, e nas COC-VEs foram identificados 30 miRNAs que não estavam presentes nas GC-VEs, sugerindo

que os dois tipos celulares secretam VEs com diferentes conteúdos, contribuindo de forma diferente para a composição das VEs do fluido folicular. Os três miRNAs exclusivos das COC-VEs, *miR-378*, *miR-106a* e *miR-let-7f*, foram associados, previamente, a altas densidades celulares durante o cultivo de células da granulosa, o que sugere que estejam associados à regulação de genes envolvidos no crescimento do folículo ovariano bovino e à proliferação e funções das células da granulosa (YENUGANTI et al., 2015). Apesar dessa associação, nos experimentos deste estudo foram mantidas, tanto para GC quanto para COC, a densidade de 5×10^5 e 10/poço respectivamente, sugerindo um mecanismo alternativo que pode regular no nível destes miRNAs.

Entre os miRNAs identificados exclusivamente nas COC-VEs dois, o *miR-132* e o *miR-155*, já foram previamente detectados em VEs do fluido folicular estando enriquecidos na porção vesicular quando comparada à porção extra-vesicular (SOHEL et al., 2013); de uma maneira controversa o *miR-365-5p* (exclusivo nas COC-VEs), o *miR-101*, o *miR-133*, o *miR-145* e o *miR-15a* (exclusivo nas GC-VEs) foram descritos como enriquecidos na porção extra-vesicular quando comparados à porção vesicular do fluido folicular (SOHEL et al., 2013), entretanto, nesse estudo, só foi analisado os miRNAs presentes na porção vesicular do FF. Mesmo assim, esses resultados reforçam a hipótese que os miRNAs são inseridos dentro de vesículas extracelulares no fluido folicular de acordo com a sua origem, concordando com trabalhos que mostram que o conteúdo das VEs é normalmente relacionado ao tipo de VE (exossomos, microvesículas entre outros) ou do tipo da célula que o originou (ABELS; BREAKFIELD, 2016).

Adicionalmente, foi descrito em humanos que o direcionamento dos miRNAs para as VEs é influenciado pela presença de sequências específicas nos próprios miRNAs, conhecidas como sequências “*motifs*” (VILLARROYA-BELTRI et al., 2013), mas em bovinos, o mecanismo ainda não foi estudado. As diferenças nos miRNAs presentes nas GC-VEs e nas COC-EVs observadas neste estudo demonstram que a comunicação mediada por vesículas é específica a cada tipo celular, entretanto, mais estudos focando nos diferentes componentes foliculares – células do cumulus, células da granulosa, células da teca, oócito e fluido folicular – são necessários para esclarecer o papel de cada componente na composição dos miRNAs presentes no ambiente folicular.

Finalmente, foram comparados os perfis de miRNAs das GCs, COCs, GC-VEs, COC-VEs com o perfil de miRNAs das FF-VEs. Os resultados foram condizentes a relatos da literatura pois os miRNAs presentes nas FF-VEs foram todos identificados em outros compartimentos celulares e já foi descrito que os

miRNAs do FF são liberados pelas células foliculares e não pelas células sanguíneas (SANTONOCITO et al., 2014) evidenciando a importância da comunicação entre os componentes celulares do ambiente folicular. Entretanto, nesse estudo, foram identificados 130 miRNAs nas FF-VEs que não foram identificados nas VEs isoladas do meio de cultivo das GCs e dos COCs. Isso pode ser devido ao fato de que o FF, *in vivo*, é um líquido que é o resultado da secreção celular durante todo o desenvolvimento folicular e, portanto, pode exibir características associadas aos eventos passados e também ao estágio atual de desenvolvimento (REVELLI et al., 2009), o que não foi avaliado neste experimento *in vitro*.

Por fim, as análises de bioinformática demonstraram que apesar das diferenças pontuais no conteúdo de miRNAs entre as células (GCs e COCs) e suas respectivas vesículas extracelulares (GC-VEs e COC-VEs), houveram várias vias em comum reguladas por estes miRNAs dos diferentes compartimentos foliculares. Nas células dentre as vias reguladas pelos miRNAs, tanto os exclusivos quanto os diferentemente expressos, observa-se uma grande quantidade de vias de sinalização, vias relacionadas as junções (aderentes e gap), via da endocitose, via de meiose e maturação oocitária; todas fundamentais no ambiente folicular sendo as três primeiras relacionadas à comunicação celular e as duas ultimas relacionadas ao desenvolvimento oocitário.

De uma forma interessante, nas vesículas extracelulares os miRNAs exclusivos regulam mais vias relacionadas à sinalização, endocitose e junções enquanto que os miRNAs diferentemente expressos estão regulando mais vias relacionadas ao metabolismo celular. Essas evidências sugerem fortemente que os miRNAs fazem parte da complexa comunicação que acontece entre as células foliculares. Sugere-se que a presença das FF-VEs facilitem essa troca de informações dentro do ambiente folicular. Estudos adicionais são necessários para esclarecer as funções precisas dessas mensagens durante o desenvolvimento folicular.

8.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos”

O crescimento oocitário e o desenvolvimento folicular requerem a vias de sinalização envolvidas com a proliferação e sobrevivência celular, como a via de sinalização da PI3K-Akt (WANG et al., 2016). O recrutamento de folículos primordiais é dependente interação entre as vias de sinalização do Notch e da PI3K-Akt, levando à proliferação de células da granulosa e ao crescimento folicular (MCLAUGHLIN et al., 2014; WANG et al., 2016). As perdas foliculares, tal qual o crescimento folicular, são estritamente controlado por redes de interação molecular que incluem a via de sinalização da PI3K-AKT. A estimulação da PI3K promove a fosforilação da Akt, resultando na ativação do crescimento e sobrevivência folicular; alternativamente, a ação da PTEN suprime esta via (MCLAUGHLIN et al., 2014). A PTEN atua na conversão do PIP3 em PIP2, e altos níveis de PTEN determinam a redução a atividade da Akt, consequentemente reduzindo a proliferação celular (MAEHAMA; DIXON, 1998; WANG et al., 2016).

Neste estudo detectamos altos níveis de mRNA do PTEN e níveis reduzidos da proteína p-Akt em células foliculares associadas a oócitos de baixa qualidade, sugerindo fortemente a menor atividade da via PI3K-Akt nestes folículos. Adicionalmente, observamos reduzidos níveis de expressão do bta-miR-494, um modulador validado do PTEN, em células foliculares associadas a oócitos de baixa qualidade. A inibição do PTEN in vitro em ovários humanos resultou em hiperativação de folículos primordiais mas comprometeu o desenvolvimento dos folículos em crescimento (MCLAUGHLIN et al., 2014).

De modo similar, em ovário de camundongo, a deleção do PTEN resulta em ampla ativação de folículos ovarianos e depleção prematura do pool de oócitos, enquanto que a deleção pontual do PTEN nas células da granulosa não afeta o início do crescimento folicular, mas aumenta a proliferação das células da granulosa e aumenta as taxas de ovulação (FAN et al., 2008; REDDY et al., 2008). O decréscimo da atividade da PTEN é também causada pelo aumento da expressão do miR-494 em células humanas do brônquio, demonstrando a efetividade do mecanismo de controle dos níveis PTEN mediado pelo miR-494, um regulador do PTEN conservado entre mamíferos (LIU et al., 2010). Assim, os nossos dados demonstram que componentes da via PI3K-Akt como o *PTEN*, o bta-miR-494 e a p-Akt estão associados, no ambiente folicular, com a capacidade de desenvolvimento ou qualidade oocitária.

O modelo experimental adotado neste trabalho permitiu avaliar o perfil molecular da via PI3K-Akt em células foliculares de folículos de baixa competência oocitária (BCO, ou seja, nas células foliculares do grupo NC ou CNB) e de alta competência oocitária (ACO, ou seja, nas células foliculares do grupo BL). Células foliculares de BCO tem perfil molecular marcado por maior expressão de *PTEN*, menor expressão de bta-miR-494 e menor quantidade de p-Akt, o que indica baixa atividade da via PI3K-Akt; de modo contrário, o grupo de ACO apresentou indicadores opostos, permitindo concluir que há maior atividade da via PI3K-Akt neste grupo.

Estes dois perfis moleculares foram associados a extremos de competência oocitária, e baseando-se em funções previamente descritas da via PI3K-Akt no ambiente folicular, é possível supor que estes extremos de competência oocitária estejam relacionados a respostas de proliferação celular, proteção ao estresse oxidativo e bloqueio da apoptose nas células foliculares (Figura 35).

Figura 35 - Modelo esquemático representando a via de sinalização da PI3K-Akt e suas respostas celulares em células foliculares ovarianas associadas à alta competência oocitária (ACO) ou à baixa competência oocitária (BCO).

Fonte: Própria autoria.

Legenda: Neste modelo a ACO representa CFs do grupo BL, enquanto que a BCO pode representar CFs dos grupos CNB e/ou NC. Pentágonos indicam se um dado componente da via da PI3K-Akt está elevado (flecha para cima) ou reduzido (flecha para baixo) nas células foliculares associadas à ACO ou à BCO. Linhas com final em ponta de seta indicam estimulação, linhas com final em barra indicam bloqueio.

A via de sinalização da PI3K-Akt, além de participar de processos de proliferação celular, também desempenha funções no controle da síntese proteica,

na regulação da sobrevivência celular ou apoptose e na via de reparo de DNA, entre outras funções (LAI et al., 2015). Neste estudo a expressão de genes relacionados a diferentes processos celulares como a apoptose (genes *BAX* e *BCL-2*), reparo de DNA (gene *BRCA*), síntese proteica (genes *EIF4b* e *EIF4e*) e proliferação celular dependente de FOXO3a (genes *FOXO3a* e *YWHAZ*) ou independente de FOXO3a (gene *CDK6*) foi determinada em CFs dos diferentes grupos com vistas a investigar quais vias celulares reguladas pela PI3K-Akt medeiam as respostas de alta ou baixa competência oocitária. Diferenças de expressão foram encontradas para os genes *FOXO3a* e *BAX* entre grupos de células foliculares associadas a distintas capacidades oocitárias de desenvolvimento.

Foi identificado neste trabalho que a expressão de *FOXO3a* estava aumentada em células foliculares de folículos contendo oócitos com maior capacidade de desenvolvimento. O fator de transcrição Forkhead box O3 (*FOXO3a*) participa da regulação da função ovariana (BRENKMAN; BURGERING, 2003) e quando ativado tem amplos efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos. Adicionalmente, a *FOXO3a* protege células quiescentes do estresse oxidativo e está relatado que a *FOXO3a* protege oócitos murinos do estresse oxidativo (KOPS et al., 2002, DI EMIDIO et al., 2014), uma vez que camundongos deficientes de *FOXO3* tem reduzida quantidade de enzimas antioxidantes como MnSOD e catalase, com consequente envelhecimento acelerado (BRENKMAN; BURGERING, 2003).

A proteína Akt ativada fosforila a *FOXO3a* e inibe sua atividade como fator de transcrição, induzindo a sua translocação do núcleo para o citoplasma, e posterior ubiquitinação e degradação (NI et al., 2007). A atividade *FOXO3a* é altamente regulada por modificações pós-traducionais, tanto aquelas determinadas pela fosforilação induzida pela Akt, como por fatores de crescimento como BDNF ou PDGF (ESSAGHIR et al., 2009). Relatos de outros autores indicam que a elevação na expressão de mRNA da *FOXO3a* não está completamente associada temporalmente à elevação de seus níveis proteicos ou à sua atividade (KANNIKE et al., 2014), possivelmente por variações na regulação no tempo de meia-vida e degradação.

As respostas induzidas por elevações da *FOXO3a* também podem variar dependendo da integração de sinais e fatores acompanhados, podendo variar do desencadeamento da morte celular, à promoção da sobrevivência através da expressão de fatores de resistência ao estresse oxidativo, muito embora a morte celular seja a resposta primária em situações de aumento atividade da *FOXO3a* (NERI, 2012). Uma vez que não se conhece neste trabalho níveis de outros fatores associados à regulação da *FOXO3a*, exceto aqueles da proteína p-Akt e a própria

expressão da *FOXO3a*, não é possível precisar qual o efeito final da *FOXO3a* nas células foliculares. Mas uma vez que neste trabalho diferentes níveis de *FOXO3a* foram encontrados em CFs associadas a extremos de competência oocitária, é possível prever que a interação Akt-*FOXO3a* atue nestes casos regulando as respostas de bloqueio ao estresse oxidativo, proliferação celular e apoptose de modo favorável (na ACO) ou desfavorável (na BCO) à aquisição de competência. Supõe-se ainda que, no grupo de elevada competência oocitária, o binômio Akt-*FOXO3a* promova transcrição de depletadores de espécies reativas de oxigênio (e do próprio *FOXO3a*, uma vez que ele atua como fator de transcrição na própria região promotora), mas também que a Akt mantenha uma inibição tal da *FOXO3a* que permita uma resposta final proliferativa e anti-apoptótica no folículo de elevada competência.

Nesse modelo de estudo específico envolvendo células foliculares e oócitos, deve-se também considerar que os efeitos dos diferentes níveis de RNA mensageiro encontrados podem não estar restritos às células foliculares. Vesículas extracelulares geradas no ambiente folicular pelas células da granulosa ou do cumulus transitam pelo fluido folicular e são capazes de entregar RNAs mensageiros para outras células dentro do folículo (revisado por DA SILVEIRA et al., 2015). Não foi demonstrado até o momento que essas VEs sejam capazes de entregar seu conteúdo diretamente para o oócito, mas o RNA mensageiro presente nas células do cumulus pode fluir para o oócito através de projeções transzonais (TZPs, (MACAULAY et al., 2014) e nos oócitos potencialmente podem se associar aos poliribossomos para gerar proteínas intra-oocitárias (MACAULAY et al., 2016). De forma interessante, o RNA mensageiro da *FOXO3a* foi identificado nas TZPs e associado aos poliribossomos oocitários (MACAULAY et al., 2016), não podendo se descartar, portanto, que variações nos níveis dos transcritos de *FOXO3a* nas células foliculares exerçam seus efeitos finais através da maquinaria traducional do oócito.

Outro gene com diferenças de expressão entre grupos de distinta competência ao desenvolvimento foi o *BAX*, o qual foi superior no grupo de maior competência. *BCL-2* e *BAX* são genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos, respectivamente, que podem ser utilizados como indicadores de apoptose em tecido ovariano (DRIANCOURT; THUEL, 1998). A competência oocitária pode estar relacionada a eventos ligados à apoptose, sendo que já foi sugerido que sinais iniciais de apoptose no oócito (LI et al., 2009) ou em células da granulosa (FENG et al., 2007) estão correlacionados positivamente com a competência oocitária, sugerindo participação dos processos apoptóticos no desenvolvimento folicular e oocitário. Os

efeitos pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos dos genes BAX e BCL-2 dependem de interações proteína-proteína.

A proteína BAX pode formar homodímeros, ou heterodímeros com a proteína BCL-2. A elevação da proporção de homodímeros de BAX em relação aos heterodímeros de BAX-BCL-2 determina o desencadeamento do processo de morte celular por apoptose. Assim, é a razão BAX/BCL-2, resultado do balanço entre esses dois componentes, o principal indicador do processo apoptótico (MARX et al., 1997; RAISOVA et al., 2001). Neste estudo a razão BAX/BCL-2 não apresentou diferenças significativas entre grupos de qualidade oocitária, e assim não há evidência clara nos nossos resultados de que a razão BAX/BCL-2 esteja regulando a aquisição de competência oocitária, como já sugerido por Yang e colaboradores (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002).

A homodimerização do BAX e translocação para a mitocôndria para desencadear a apoptose está sob influência direta da proteína p-Akt (GARDAL et al., 2004). A p-Akt fosforila a proteína BAX e regula sua atividade, de tal modo que a fosforilação do BAX impede sua translocação para a mitocôndria, e induz sua manutenção no citoplasma em formação heterodimérica com o BCL-2, prevenindo a apoptose. Nos resultados descritos neste trabalho o grupo BL apresenta, além da elevação do *BAX*, também elevação da p-Akt. Dessa forma, há indícios que nestas células a elevação do *BAX* não determine maior ocorrência de apoptose dada a sua inatividade em decorrência da fosforilação induzida pela p-Akt. Por outro lado, no grupo CNB, há elevação do *BAX* nas CFs, não acompanhada de elevação de p-Akt, permitindo supor maior probabilidade de ocorrência de apoptose, mesmo que não acompanhada de elevação da razão *BAX/BCL-2*.

Finalmente, a p-Akt também tem efeitos no controle da apoptose através da regulação da disponibilidade de BCL-2. BCL-2 e BAD formam heterodímeros, tornando o BCL-2 indisponível para formar heterodímeros com BAX. A fosforilação da BAD pela p-Akt provoca o sequestro da BAD por proteínas da família 14-3-3, e consequente efeito anti-apoptótico (PUGAZHENTHI et al., 2000). Assim, a p-Akt, quer seja pela fosforilação e sequestro da BAD, quer seja pela fosforilação do BAX e sua manutenção no citoplasma, provoca uma resposta anti-apoptótica na célula.

A competência oocitária é um processo multifatorial e enquanto alguns processos básicos são bem conhecidos, tal como a progressão da meiose e migração de grânulos corticais, aqueles processos mais aprofundados e relacionados aos eventos moleculares que levam à formação de um oócito capaz de sustentar o desenvolvimento ainda são pouco compreendidos. Diversos fatores possam afetar a qualidade oocitária e regular sua aquisição de competência.

Particularmente, o microambiente folicular tem sido apontado como um dos fatores chave para determinar adequado crescimento oocitário, maturação, fertilização, desenvolvimento embrionário inicial e desenvolvimento a termo (KRISHER, 2013).

8.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”

As células foliculares interagem constantemente com o oócito em desenvolvimento. Essas células podem refletir a “saúde” geral do oócito e indicar a capacidade de se desenvolver em embriões (KORDUS; LAVOIE, 2017). Biomarcadores em células do cumulus associadas aos oócitos individuais tem potencial para serem utilizadas para indicar quais oócitos e/ou embriões têm melhor chance de se desenvolver, implantar e completar a gestação.

Vários genes expressos em células do cumulus tem sido descritos como biomarcadores, mas os resultados são inconsistentes devido às diferentes metodologias utilizadas, tanto para avaliar os oócitos quanto para os métodos de coleta das amostras (CHRONOWSKA, 2014; FRAGOULI et al., 2014). Nesse estudo, foi utilizado um modelo retrospectivo de ativação partenogenética individual e as células do cumulus foram utilizadas para conhecer/identificar o perfil de RNAs, tanto mensageiros quanto de miRNAs, que estão relacionados à capacidade ou incapacidade do oócito em desenvolver-se até o estágio de blastocisto.

O perfil de RNAs mensageiros das células do cumulus entre os grupos NC e CNB foram semelhantes, com exceção apenas do gene *MT2A*, metalotioneína 2A. Esse gene é responsável por codificar fatores de resistência ao estresse oxidativo (SHIMAZU et al., 2013) e já foi descrito relacionado à resposta ao dano oxidativo em complexos cumulus-oocitários de suínos (BLAHA et al., 2015). O *MT2A* estava menos expresso no grupo de células do cumulus associadas à oócitos de menor qualidade oocitária (NC) podendo indicar uma baixa resistência ao estresse nessas células consequentemente, prejudicando o desenvolvimento dos oócitos associados a elas.

Quando comparados os grupos extremos de qualidade NC e BL, o RNAseq identificou 983 genes diferentemente expressos. Os 10 genes, relacionados à qualidade, com maior diferença de expressão entre esses grupos foram *FOXL2*, *IGF2*, *FIZ1*, *CDC25B*, *CDCA3*, *GLIS2*, *ABLIM3*, *PRKCDBP*, *USE1* e *ZNF444*. Alguns deles com funções interessantes no ambiente folicular como, por exemplo, o gene *FOXL2*, *forkhead protein L2*, que é o primeiro marcador conhecido de diferenciação sexual, pode atuar na diferenciação das células somáticas e ainda na manutenção e

desenvolvimento folicular (COCQUET et al., 2002), sua expressão é regulada por fatores secretados pelo oócito (EMORI et al., 2013). O aumento na expressão do fator de transcrição *FOXL2* atrasa a progressão do ciclo celular e protege as células da granulosa do dano oxidativo, através da estimulação da produção de agentes antioxidantes (BENAYOUN et al., 2011). Nesse caso, uma maior produção de agentes antioxidantes pode justificar sua maior expressão nas células do cumulus que geraram oócitos de maior capacidade ao desenvolvimento.

O segundo marcador, o gene *imprinted IGF2, insulin-like growth fator 2*, e seus receptores são menos expressos em células da granulosa de mulheres com reserva ovariana diminuída quando comparadas àquelas com reserva ovariana normal (mulheres jovens) (GREENSEID et al., 2011). Adicionalmente em folículos atréticos, os níveis de *IGF2* são inferiores aos folículos saudáveis (CATALDO; GIUDICE, 1992). Sugerindo que esse transcrito está associado à qualidade folicular e consequentemente oocitária assim como identificado no nosso estudo.

O gene *CDC25B* é amplamente estudado na relação de retomada da meiose em oócitos e tem papel essencial durante a transição da prófase I para a metáfase I em oócitos de camundongos (LINCOLN et al., 2002). Conforme observado em nossos dados, uma maior quantidade deste transcrito pode estar associado a retomada da meiose mais eficiente, consequentemente, uma maior qualidade oocitária ao se desenvolver até o estágio de blastocisto.

O gene *ABLIM3 (actin biding LIM protein member 3)*, no ambiente folicular, é mais expresso em células do cumulus do que nas demais células. Este gene está relacionado à foliculogênese e à diferenciação celular. A proteína codificada por ele interage com filamentos de actina e pode ser um componente de junções de aderência, participando assim de funções importantes como sinalização e interação célula-célula (KOKS et al., 2010). Funções estas que são essenciais para uma adequada aquisição de competência oocitária o que justificaria sua maior expressão nas células do cumulus associadas aos oócitos de melhor competência ao desenvolvimento embrionário inicial.

Não foram encontrados estudos relacionando os genes *FIZ1, CDCA3, GLIS2, PRKCDBP, USE1* e *ZNF444* à funções em componentes do folículo ovariano, sendo pela primeira vez descritos em relação à qualidade oocitária nesse trabalho. Alguns deles têm funções descritas em outros tecidos e células que poderiam ser favoráveis durante o desenvolvimento folicular e oocitário como, por exemplo, o gene *CDCA3* que em células cancerígenas estimula a proliferação, através da regulação do ciclo celular (UCHIDA et al., 2012). Mais estudos são necessários para entender a função

desses genes nas células do cumulus e como podem estar favorecendo a qualidade oocitária.

Alguns outros genes, também diferentemente expressos nos resultados do RNAseq já foram descritos na literatura como sendo associados à qualidade ou não de oócitos. Um dos modelos de avaliação de qualidade oocitária mais utilizados em estudos científicos é o método de coloração azul cresil brilhante, conhecido como método BCB. Esse método é baseado na atividade da enzima G6PDH (glicose-6-fosfato-desidrogenase), essa enzima é sintetizada em oócitos em crescimento mas está inativa em oócitos que finalizaram seu crescimento. Os genes *RARRES2* (*retinoic acid receptor responder*) e *VIM* (*vimentin*) já foram correlacionados com qualidade oocitária, utilizando o método BCB (JANOWSKI et al., 2012) e apresentaram resultados semelhantes nesse estudo sendo mais expressos no grupo BL, confirmando seu potencial como marcadores.

De modo contrário, o gene *MRPS2* (*ATP binding cassette subfamily C member 2*) que é associado à incompetência no modelo BCB, no nosso estudo, apresentou maiores níveis nas células de oócitos de melhor qualidade (JANOWSKI et al., 2012). E, em um recente estudo, também utilizando o modelo de qualidade BCB, os transcritos *GREM1* (*Gremlin 1* - antagonista dos BMPs), *HAS2* (*hyaluronan synthase 2*) e *FGF2* (*fibroblast growth factor 2*) estavam mais expressos em células do cumulus associadas a oócitos de maior qualidade (DHALI et al., 2017), resultados contrários aos encontrados neste estudo, no qual estes transcritos foram mais expressos no grupo de células do cumulus associadas aos oócitos de pior qualidade. Essas variações podem acontecer devido a diversos fatores, dentre eles, a forma de avaliação dos oócitos, o momento de coleta das amostras e os meios de cultivo utilizados. Portanto, estudos funcionais seriam ideais para avaliar o real potencial desses genes como marcadores de qualidade oocitária.

Nesse estudo, aproximadamente 52 genes relacionados às proteínas ribossomais foram mais expressos no grupo de maior qualidade, BL, quando comparado ao NC e 12 genes mais expressos no BL quando comparado ao grupo CNB, destacando a importância da atividade ribossomal no processo de aquisição de competência oocitária. Sabe-se que aproximadamente 65% dos genes produzidos pelos oócitos que completaram seu crescimento correspondem a RNAs ribossomais (WASSARMAN; KINLOCH, 1992), sugerindo a importância desses genes ribossomais no final do crescimento e na composição dos estoques de mRNAs dos oócitos para suportar o desenvolvimento embrionário inicial.

Foi previamente demonstrado que as proteínas ribossomais têm uma importante função no controle da expressão gênica global e, consequentemente, no

desenvolvimento embrionário em camundongos e que mutações em uma única proteína ribossomal já pode trazer grandes prejuízos (KONDRASHOV et al., 2011). O que foi observado através da depleção da proteína Cx43, a qual provocou uma redução em diversas proteínas ribossomais em oócitos e em blastocistos, sugerindo que essa deleção afete também o processo de aquisição de competência do oócito (PLAKS et al., 2014) assim como observado nesse estudo.

Nas análises de enriquecimento, as vias mais ativas nas células de cumulus associadas aos oócitos de melhor qualidade BL quando comparados ao grupo NC, estão as vias dos ribossomos além também de vias do metabolismo (ácido oxicarboxílico, frutose e manose e tiamina). De forma semelhante, as vias mais ativas nas células de cumulus associadas aos oócitos de melhor qualidade BL, quando comparados ao grupo CNB, são vias dos ribossomos, via da pentose fosfato e vias de metabolismo (frutose e manose, tiamina e ácido oxicarboxílico). A via de interação de receptores da matriz extracelular foi a única via mais ativa no grupo CNB quando comparado ao grupo BL. Mais estudos são necessários para relacionar a atividade e influência dessas vias com a capacidade do oócito em desenvolver até o estágio de blastocisto.

Nas análises dos miRNAs, 19 foram exclusivos no grupo NC, 21 no grupo CNB, 15 no grupo de BL e além desses outros 16 foram diferentemente expressos entre os grupos. Através de ferramentas de bioinformática, observamos que os miRNAs exclusivos dos três diferentes grupos são preditos por regularem vias importantes durante o desenvolvimento folicular e oocitário como as vias de sinalização da MAPK, FOXO, TGF-beta, ErbB, atividade de junções diversas, endocitose entre outras. De maneira curiosa a via da meiose oocitária só aparece sendo regulada pelos miRNAs exclusivos do grupo de células do cumulus associadas aos oócitos de pior qualidade (NC). O que pode significar que nessas células essa via apresente uma maior necessidade de regulação.

Dentre estes miRNAs exclusivos de cada grupo, a maioria ainda não têm funções descritas relacionadas com o desenvolvimento folicular, oocitário e embrionário inicial, mas alguns já foram estudados. O *bta-miR21-5p* que foi identificado neste estudo associado à células do cumulus de oócitos de melhor qualidade já foi associado ao aumento na taxa de ovulação pela função anti-apoptótica em camundongos (CARLETTI et al., 2010) e relacionado positivamente ao desenvolvimento folicular em cabras (ZI et al., 2017). O *miR-21* também foi relacionado a diminuição da apoptose em células do cumulus via regulação na via de sinalização PI3K/Akt (HAN et al., 2017) e, contraditoriamente, em humanos, a expressão miR-21-5p foi significativamente maior em células do cumulus de

pacientes que respondem menos ao tratamento de fertilização *in vitro* (KARAKAYA et al., 2015). Embora alguns miRNAs, como o *miR-21*, já tenham sido identificados no ambiente folicular são necessários estudos para validar genes alvos e entender a função destes miRNAs no processo de aquisição de competência.

Entre os miRNAs que foram diferentemente expressos, três estavam aumentados nas células do cumulus associados à oócitos de melhor qualidade *bta-miR-130b*, *bta-miR-135b* e *bta-miR-449b*. Dentre eles, o *miR-130b* foi relacionado a a proliferação e sobrevivência das células da granulosa e do cumulus, a maturação oocitária e também a melhores taxas de formação de mórulas e de blastocistos (SINHA et al., 2017) sendo, portanto, benéfico ao desenvolvimento oocitário e embrionário inicial, assim como em nosso estudo, no qual foi mais expresso em células do cumulus associadas à oócitos de melhor qualidade. Outro miRNA associado à qualidade neste estudo foi o *miR-449b*, o qual já foi descrito em blastocistos bovinos como um regulador do gene *NOTCH* (GOOSSENS et al., 2013), que codifica uma família de proteínas transmembrânicas que controlam as decisões do destino celular entre células adjacentes, modulando a proliferação celular, a diferenciação e a sobrevivência (TROMBLY et al., 2009).

Dentre os alvos fortemente validados dos miRNAs associados à qualidade (*miR-130b*, *miR-135b* e do *miR-449b*) estão os genes *TPS3INP1*, *ITGB1*, *APC*, *SMAD5*, *BMPR2* e o *SIRT1* os quais foram encontrados menos expressos no grupo dos BL quando comparados aos NC e os genes *APC*, *BMPR2*, *TGFBR1*, *SMAD5* e *SIRT1*, também menos expressos no grupo dos BL quando comparados ao grupo CNB, demonstrando uma possível regulação desses genes por estes miRNAs. Curiosamente, nenhum gene fortemente regulado por estes miRNAs estavam aumentados no grupo BL.

Com relação aos alvos fortemente validados dos miRNAs mais expressos no grupo de menor qualidade NC (*bta-miR-223*, *bta-miR-296-5p* e do *bta-miR449a*). O *miR-223* já foi descrito atuando na regulação de vias como a da PI3K-Akt e IGF1R regulando funções de proliferação e apoptose (JIA et al., 2011; YU et al., 2013; HUANG et al., 2014; HAN, et al., 2016; HAN et al., 2017). Sendo a primeira via de sinalização, PI3K-Akt, bastante discutida no estudo 2. Em relação à via do *IGF1R*, esta é essencial para proliferação e diferenciação das células do cumulus (BAUMGARTEN et al., 2014), também para a esteroidogênese, sobrevivência folicular e fertilidade (BAUMGARTEN et al., 2017). Outro miRNA, o *miR449a*, foi descrito como regulador de apoptose através do gene alvo BCL2 (WEI et al., 2013; HAN et al., 2016). No entanto, neste presente estudo este gene não teve níveis de

transcritos alterados com relação à qualidade oocitária, nas células foliculares, no estudo 1, ou do cumulus, no estudo 3.

Os outros dez miRNAs (*miR-196a*, *miR-1225-3p*, *miR-1343-3p*, *miR-218*, *miR-23b-5p*, *miR-24*, *miR-760-5p*, *miR-455-3p*, *miR-483* e o *RNU43*) diferentemente expressos não tiveram uma relação com a qualidade pois, não possuíram diferença de expressão entre os grupos extremos de qualidade.

Para melhor explorar os resultados e identificar quais funções biológicas as interações mRNAs-miRNAs estão regulando durante o processo de aquisição de competência oocitária são necessárias análises de interactoma pois, as alterações transcriptômicas podem ocorrer pela regulação por miRNAs. As redes interativas revelam uma nova visão dos procedimentos biológicos a nível molecular podendo auxiliar no desenho de estudos funcionais que avaliem suas funções durante esse processo final de maturação e aquisição de qualidade oocitária.

8.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”

Sabe-se que o cultivo *in vitro* causa alterações genéticas, epigenéticas e também alterações metabólicas ao oócito (KATZ-JAFFE et al., 2009). Nesse estudo avaliamos alterações em RNAs mensageiros nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e também se a qualidade do oócito considerando sua capacidade em se desenvolver até o estágio de blastocisto está associada a alterações em alguns destes transcritos nas células do cumulus após a maturação.

Comparando apenas os sistemas de maturação *in vitro* com o *in vivo* 13 genes apresentaram diferença estatística, os quais são transcritos relacionados a funções celulares como: síntese e metabolismo proteico (*HPRT1*, *LUM*), retomada da meiose (*NPR2*), mecanismos anti-apoptóticos e de crescimento celular (*IGF1R*), resposta ao estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático (*CAT*, *BDNF*, *GPX1*, *NOS2*, *SOD1*), remodelamento epigenético (*H2AFZ*, *HDAC2*), atividade mitocondrial (*FDX1*) e ativação de miRNAs (*DICER1*). Alguns deles, devido a sua importância no ambiente folicular, serão discutidos posteriormente.

O gene *LUM* (*Lumican*), relacionado à expansão das células do cumulus, codifica um proteoglicano da matriz extracelular rico em leucina. Essa proteína foi encontrada super expressa após a maturação *in vitro* em oócitos bovinos (MAMO et al., 2011) e nossos resultados também indentificaram este gene com menores níveis de expressão nas células do cumulus de oócitos maturados *in vivo*, comprovando

que existem diferenças na composição da matriz extracelular devido ao ambiente *in vitro*.

O gene *NPR2* (*natriuretic peptide receptor 2*) é essencial para que o oócito permaneça na fase de prófase I da meiose. As células do cumulus expressam o receptor *NPR2* e as células da granulosa expressam seu ligante *NPPC*. Nesse estudo, esse gene foi mais expresso nas células do cumulus de oócitos maturados *in vivo*, isso pode acontecer devido ao fato da expressão desse receptor ser estimulada e mantida pelo estradiol (ZHANG et al., 2011), o qual não foi utilizado nos meios de maturação *in vitro*.

O *IGF1*, ligante do gene *IGF1R*, é um estimulador da proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular, regulando positivamente a esteroidogênese e a apoptose das células da granulosa durante o desenvolvimento folicular através da ativação da via de sinalização PI3K-Akt (MANI et al., 2010). A expressão do *IGF1R*, normalmente é maior nos oócitos do que nas células do cumulus (MCELROY et al., 2010). Pouco se sabe sobre o papel *in vivo* da via de sinalização de insulina em oócitos durante o desenvolvimento folicular, embora a exposição a insulina ou IGF1 *in vitro* melhore a maturação de oócitos. No entanto, o *IGF1R* não é obrigatório para o crescimento, diferenciação e maturação em camundongos (PITETTI et al., 2009) e neste estudo os níveis do transcrito *IGF1R* foram menores no grupo de células do cumulus *in vivo*.

Dois genes, *CAT* (*Catalase*) e *NOS2* (*Nitric Oxide Synthase 2*), relacionados à resposta ao estresse estavam menos expressos no grupo *in vivo*. A catalase é uma enzima que neutraliza espécies reativas de oxigênio, que assim como neste estudo já foi descrita com níveis diminuídos nas células do cumulus de oócitos maturados *in vivo* (JOZWIK et al., 1999), os quais possuem maior competência a se desenvolver até o estágio de blastocistos (RIZOS et al., 2002) e, conseqüentemente de melhor qualidade. Esta enzima apresentou aumento significativo em fluido folicular associado a oócitos de menor competência, sugerindo uma maior necessidade de proteção antioxidante devido a um maior nível de dano oxidativo no FF de oócitos com baixo potencial de fertilização (REVELLI et al., 2017). O transcrito *NOS2* é relacionado à resposta ao estresse oxidativo e senescência, quando comparadas células do cumulus entre mulheres jovens e mais velhas (MOLINARI et al., 2016), contudo, menos expresso em células do cumulus de melhor qualidade assim como neste estudo. Sugerindo uma menor necessidade de resposta ao estresse em células do cumulus associadas aos oócitos de melhor qualidade.

O transcrito da glutathiona peroxidase 1 (*GPX1*) expresso nos COCs bovinos em resposta a fatores endógenos secretados pelos oócitos e está associado a

maiores taxas de maturação, fertilização monospermática e formação de blastocistos (DEY et al., 2012). De forma semelhante, neste trabalho, este transcrito foi mais expresso nas células do cumulus associadas aos oócitos maturados *in vivo*.

Com relação aos genes relacionados com as alterações epigenéticas o gene *HDAC2* foi menos expresso no grupo *in vivo* quando comparado aos grupos *in vitro*. A família das histonas deacetilases (HDACs) no oócito estão relacionadas à instabilidade dos RNAs mensageiros e nos embriões com a repressão da transcrição (HARA et al., 2005; MEDVEDEV et al., 2008). A enzima HDAC2 é importante durante a maturação, desacetilando as histonas após a quebra da vesícula germinativa para que ocorra a compactação da cromatina, garantindo estabilidade cromossomal e uma correta divisão meiótica (MA; SCHULTZ, 2016). Assim como nesse trabalho, em um estudo prévio de Bessa e colaboradores (2012) o gene da HDAC2 demonstrou uma relação entre mudança de expressão e competência (BESSA et al., 2013). Além da *HDAC2*, o outro gene relacionado à modificações epigenéticas *H2AFZ* também estavam em menor expressão nas células do cumulus dos oócitos maturados *in vivo*, deixando mais uma vez clara a relação do cultivo *in vitro* com as alterações epigenéticas.

O gene responsável por codificar a enzima DICER1 foi mais expresso em células do cumulus do grupo *in vivo* com uma diferença expressiva. Essa enzima é responsável pela clivagem de miRNAs precursores em miRNAs maduros que, quando associados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) regulam a expressão gênica pós-transcricional (HALE et al., 2015). Durante o desenvolvimento oocitário e embrionário inicial há uma significativa regulação pós-transcricional, com o armazenamento, a tradução e a degradação controlada de mRNAs. Além disso, a Dicer é, provavelmente, essencial para repor transcritos maternos que costumam ser perdidos durante a maturação oocitária (MURCHISON et al., 2007).

Ao comparar apenas os grupos *in vitro* 9 transcritos tiveram diferenças estatísticas entre os grupos de qualidade oocitária (NC, CNB e BL). Esses genes demonstram que houveram alterações em genes relacionados à variados efeitos celulares como apoptose (*CASP3*), resposta ao estresse oxidativo e estresse do retículo (*GPX4* e *SOD1*), expansão das células do cumulus (*GREM1*, *IMPDH1* e *IMPDH2*), acúmulo lipídico (*PLIN3*) e remodelamento epigenético (*DNMT1* e *H3F3A*). Com excessão do gene *DNMT1* os outros genes com diferenças de expressão entre os grupos *in vitro* estavam mais expressos no grupo NC quando comparado ao grupo BL. Esses resultados demonstram, nessas células do cumulus, uma possível desregulação nas funções relacionadas à apoptose, estresse,

expansão, acúmulo lipídico e remodelamento epigenético que podem estar prejudicando o desenvolvimento oocitário. Causando, por exemplo, acúmulo lipídico excessivo e estresse do retículo funções que são sabidamente prejudiciais a adequada maturação e a fertilidade (WU et al., 2010; YANG et al., 2012).

De uma forma geral, avaliando os genes alterados, neste estudo, entre os diferentes grupos de células do cumulus, observou-se que há uma grande desregulação de genes relacionados à sinalização GMPc e retomada da meiose como os transcritos *NPR2*, *NOS2*, *IGF1R*, *IMPDH1* e *IMPDH2* como era esperado devido ao sistema *in vitro* alterar e acelerar o processo de retomada da meiose. Observamos que a qualidade do oócito associado à estas células também provocou alterações em transcritos associados ao processo de retomada da meiose. Evidenciando que, embora as células somáticas foliculares desempenhem um papel essencial na inibição da retomada da meiose é o oócito quem regula todo o processo (WIGGLESWORTH et al., 2013).

Por fim, outra observação importante é que nos transcritos alterados entre os grupos *in vitro*, nota-se que a maioria (*CASP3*, *GREM1*, *IMPDH1*, *IMPDH2*, *PLIN3*, *DNMT1* e *H3F3A*), com exceção aos transcritos de resposta ao estresse (*GPX4* e *SOD1*), o padrão de expressão entre o grupo *in vivo* assemelha-se aos grupos de células do cumulus correspondente aos oócitos de melhor qualidade *in vitro* (CNB ou BL). Isso sugere que quanto menos as células do cumulus são alteradas pelo sistema *in vitro*, menos o oócito é prejudicado e tem mais competência a se desenvolver até o estágio de blastocisto.

9 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

9.1 Conclusões e considerações finais gerais

Conhecer um pouco mais os componentes do folículo ovariano e como eles influenciam no processo de aquisição de competência oocitária foi o objetivo deste trabalho. Sabendo-se que as células foliculares precisam trabalhar em conjunto e que estão sob constante e recíproca dependência observou-se a necessidade de estudar os componentes foliculares que podem refletir a qualidade do oócito em desenvolvimento. No primeiro estudo observamos que cada uma tem uma parcela de contribuição na composição dos miRNAs deste ambiente, mas com muita sincronia das importantes vias celulares a serem reguladas. No segundo estudo a regulação da via de sinalização PI3K-Akt nas células foliculares reflete na qualidade do oócito que será produzido. No estudo três, ficou claro que o perfil de mRNAs e de miRNAs das células do cumulus de oócitos com diferentes capacidades ao desenvolvimento é diferente. As análises de bioinformática indicaram que as principais diferenças estão relacionadas aos ribossomos (capacidade estrutural e funcional) e ao metabolismo. E por fim, no quarto estudo, o perfil de RNAs, tanto dos miRNAs como dos mRNAs, das células do cumulus se altera conforme o tipo de maturação *in vitro*, *in vivo* e a qualidade oocitária, evidenciando as alterações epigenéticas e uma desregulação gênica causadas pelo sistema *in vitro* e que, considerando as diferenças encontradas somente entre os grupos *in vitro*, parece que quando as células do cumulus sofrem menos alterações pelo sistema de maturação *in vitro* os oócitos tem mais chances de alcançar o estágio de blastocisto.

9.2 Conclusões e considerações finais específicas

9.2.1 Estudo 1. “A origem e o papel dos microRNAs, das células e das vesículas extracelulares, no microambiente do folículo ovariano bovino”

O ambiente folicular é composto por diferentes tipos celulares que precisam funcionar em unidade para que o folículo consiga oferecer ao oócito o ambiente ideal para seu desenvolvimento. Através dos dados obtidos neste estudo observamos que os diferentes componentes foliculares avaliados (GC, COC, GC-VEs e COC-VEs) contribuem de forma distinta para o perfil de miRNAs do fluido folicular (FF-VEs). Embora cada compartimento, tanto celular como vesicular, tenha particularidades em seu perfil (miRNAs exclusivos e diferentemente expressos) em

geral, esses miRNAs estão modulando vias de sinalização ou vias do metabolismo celular semelhantes que já foram descritas como importantes durante o desenvolvimento folicular e, consequentemente oocitário. Estudos para esclarecer o papel dos miRNAs no desenvolvimento folicular e no processo de aquisição de qualidade são importantes pois ajudam a entender o ambiente folicular *in vivo* para aprimorar as tecnologias de produção e manipulação de gametas e embriões *in vitro*.

9.2.2 Estudo 2. “A via de sinalização PI3K-Akt associada a competência oocitária em bovinos

Utilizando um modelo de desenvolvimento embrionário que permitia a análise retrospectiva de componentes foliculares interrogou-se se a via de sinalização PI3K-Akt estaria associada à qualidade oocitária. Este modelo permitiu comparar os perfis moleculares da via de sinalização da PI3K-Akt em células foliculares associadas à baixa competência oocitária (BCO, ou seja, nas células foliculares do grupo NC ou CNB) e à alta competência oocitária (ACO, ou seja, nas células foliculares do grupo BL). Foi possível determinar que um perfil molecular da via de sinalização da PI3K-Akt, consistindo de reduzidos níveis de *PTEN* e elevados níveis de p-Akt, *FOXO3a*, *miR-494*, *miR-19b*, *miR-20a*, *miR-92b* e *BAX* estavam associados ao maior potencial de desenvolvimento. Esse perfil molecular é compatível com respostas celulares de proteção ao estresse oxidativo, proliferação celular e bloqueio da apoptose, sugerindo que estes processos celulares induzidos pela via da PI3K-Akt contribuem para a aquisição da competência oocitária durante a oogênese.

9.2.3 Estudo 3. “O perfil de microRNAs e RNAs mensageiros das células do cumulus relacionado à qualidade oocitária em bovinos”

Conhecer as diferenças existentes entre as células do cumulus de oócitos com baixa e alta competência ao desenvolvimento embrionário é essencial para fundamentar novos estudos funcionais a fim de melhorar os resultados das tecnologias de reprodução assistida além de melhorar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Através dos resultados obtidos, tanto dos miRNAs como dos mRNAs, observou-se que os perfis das células do cumulus dos grupos experimentais estudados são diferentes, sendo capazes de separar as células do cumulus de diferentes grupos, e que em conjunto esses miRNAs e mRNAs participam de vias celulares importantes durante o desenvolvimento folicular,

oocitário e embrionário inicial. Estudos funcionais são necessários para validar e avaliar a função e, também, a participação da atividade dos ribossomos no processo de aquisição de competência, já que, em todas análises de bioinformática vias e processo celulares relacionados a essas proteínas foram diferentes entre os grupos extremos de qualidade.

9.2.4 Estudo 4. “Alterações em mRNAs nas células do cumulus de acordo com o tipo de maturação *in vivo* x *in vitro* e a qualidade oocitária”

Muitos fatores afetam a qualidade oocitária, as comparações de transcritos feitas neste estudo claramente demonstram que o meio *in vitro* causa algumas dessas alterações, incluindo alterações relacionadas ao metabolismo proteico, apoptose, resposta ao estresse, atividade mitocondrial, maturação de miRNAs e principalmente alterações epigenéticas, as quais são frequentemente estudadas mas, ainda, não é descrita uma forma eficiente de controlá-las. Algumas alterações em células do cumulus influenciaram a capacidade dos oócitos em desenvolver-se até o estágio de blastocisto, em geral foram também relacionadas à apoptose, resposta ao estresse, remodelamento epigenético além de alterações em genes de expansão e crescimento celular e acúmulo lipídico. Por fim, neste estudo observou-se que quando há diferença de expressão entre os grupos *in vitro*, na maioria dos genes o padrão de expressão das células do cumulus associadas aos oócitos de melhor qualidade assemelha-se ao padrão das células do cumulus de oócitos maturados *in vivo*. Sendo os oócitos maturados *in vivo* superiores em qualidade aos oócitos maturados *in vitro* sugere-se uma boa forma de validar o modelo de qualidade utilizado neste estudo.

REFERÊNCIAS

AALBERTS, M. et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, Annexin A1, and GLIPR2 in humans. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 86, n. 3, art. 82, p. 1-8, Mar. 2012.

ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. **Cellular and Molecular Neurobiology, New York**, v. 36, n. 3, p. 301-312, Apr. 2016.

AKERS, J. C. et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 113, n. 1, p. 1-11, May 2013.

AMBEKAR, A. S. et al. Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. **Journal of Proteomics**, v. 87, p. 68-77, Jul. 2013.

ANDRADE, G. M. et al. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1-10, 2017a. (Early view).

ANDRADE, G. M. et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185045, 2017b.

ANDREAS, E. et al. MicroRNA 17–92 cluster regulates proliferation and differentiation of bovine granulosa cells by targeting PTEN and BMPR2 genes. **Cell and Tissue Research**, v. 366, n. 1, p. 1-12, Oct. 2016.

ARAVIN, A.; TUSCHL, T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. **Febs Letters**, v. 579, n. 26, p. 5830-5840, Oct. 2005.

ASEA, A. et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 1, p. 12-17, Oct. 2008.

ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, May 2000.

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

ASSOU, S. et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 711-719, Dec. 2008.

BAUMGARTEN, S. C. et al. IGF1R expression in ovarian granulosa cells is essential for steroidogenesis, follicle survival, and fertility in female mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 7, p. 2309-2318, Jul. 2017.

BAUMGARTEN, S. C. et al. IGF1R Signaling is necessary for fsh-induced activation of akt and differentiation of human cumulus granulosa cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 8, p. 2995-3004, Aug. 2014.

BECKER, L. E. et al. The role of miR-200a in mammalian epithelial cell transformation. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 1, p. 2-12, Jan. 2015.

BENAYOUN, A. B.; GEORGES, A. B.; L'HÔTE, D.; ANDERSSON, N.; DIPIETROMARIA, A.; TODESCHINI, A.; CABURET, S.; BAZIN, C.; ANTTONEN, M.; VEITIA, R. A. Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 9, p. 1 May 2011.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BERGANDI, L. et al. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase 1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. **Reproductive Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1370-1377, Nov. 2014.

BESSA, I. R. et al. Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 781-789, Oct. 2013.

BEVERS, M. M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 13-22, Jan. 1997.

BIANCHI, L. et al. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation. **Journal of Proteomics**, v. 90, p. 61-76, Sep. 2013.

BLAHA, M. et al. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, art. 113, Oct. 2015.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, n. 1, p. 54-62, May 1995.

BLONDIN, P. et al. Improving oocyte quality in cows and heifers - what have we learned so far? **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 281-289, Jul.-Sep. 2012.

BOURGON, R.; GENTLEMAN, R.; HUBER, W. Independent filtering increases detection power for high-throughput experiments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, p. 9546-9551, May 2010.

BRENMANN, A. B.; BURGERING, B. M. T. FoxO3a eggs on fertility and aging. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 11, p. 464-467, Nov. 2003.

BUENO, M. J.; PEREZ DE CASTRO, I.; MALUMBRES, M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. **Cell Cycle**, v. 7, n. 20, p. 3143-3148, Oct. 2008.

BURATINI, J. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and-4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 343-350, Sep. 2005.

BURATINI JUNIOR, J. et al. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 4, p. 743-750, 2007.

BURNETT, L.; NOWAK, R. Exosomes mediate embryo and maternal interactions at implantation and during pregnancy. **Frontiers in Bioscience (Scholar edition)**, v. 8, p. 79-96, 2015.

CABY, M. P. et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International Immunology**, v. 17, n. 7, p. 879-887, Jul. 2005.

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

CATALDO, N. A.; GIUDICE, L. C. Insulin-like growth-factor binding-protein profiles in human ovarian follicular-fluid correlate with follicular functional status. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 74, n. 4, p. 821-829, Apr. 1992.

CHAKRABORTY, C. et al. MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42683-42697, Jul. 5, 2016.

CHENG, E. H. et al. Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality. **Human Reproduction**, v. 28, n. 4, p. 929-936, Apr. 2013.

CHRONOWSKA, E. High-throughput analysis of ovarian granulosa cell transcriptome. **Biomed Research International**, art. 213570, p. 1-7, 2014.

CILLO, F. et al. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 645-650, Nov. 2007.

CLARKE, H.J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, 2017.

COCQUET, J. et al. Evolution and expression of FOXL2. **Journal of Medical Genetics**, v. 39, n. 12, p. 916-921, Dec. 2002.

COMBELLES, C. M. H. et al. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 139, n. 5, p. 871-881, May 2010.

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

CORTEZ, M. A.; CALIN, G. A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 9, n. 6, p. 703-711, Jun 2009.

CRESCITELLI, R. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, art. 20677, p. 1-10, 2013.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. **Plos One**, v. 12, n. 6, art. e0179451, p. 1-25, June 2017.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 12, p. 1474-1483, Dec. 2015.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Cell-Secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, art. 71, p. 1-10, Mar. 2012.

DATTA, S. R. et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell** 91, 231-241, 1997.

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, art. 2645, June 2017.

DEY, S. R. et al. Coculturing denuded oocytes during the in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1064-1077, Apr. 2012.

DI EMIDIO, G. et al. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. **Human Reproduction**, v. 29, n. 9, p. 2006-2017, Sept. 2014.

DI PIETRO, C. Exosome-mediated communication in the ovarian follicle. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 3, p. 303-311, Mar. 2016.

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

DONADEU, F. X.; SCHAUER, S. N.; SONTAKKE, S. D. Involvement of miRNAs in ovarian follicular and luteal development. **Journal of Endocrinology**, v. 215, n. 3, p. 323-334, Dec. 2012.

DRAGOVIC, R. A. et al. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 5, p. 848-857, May 2007.

DRIANCOURT, M. A.; THUEL, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, n. 4, p. 345-362, July-Aug. 1998.

DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, p. 303-316, Feb. 2015.

ELFOULY, M. A. et al. Role of ovum in follicular lutenization. **Endocrinology**, v. 87, n. 2, p. 288-293, Aug. 1970.

- EMORI, C.; SUGIURA, K. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. **Animal Science Journal**, v. 85, n. 6, p. 627-633, June 2014.
- EMORI, C. et al. Cooperative effects of 17 beta-Estradiol and oocyte-derived paracrine factors on the transcriptome of mouse cumulus cells. **Endocrinology**, v. 154, n. 12, p. 4859-4872, Dec. 2013.
- EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C.; OBRIEN, M. J. Developmental capacity of mouse oocytes matured invitro - effects of gonadotropic stimulation, follicular origin and oocyte size. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 1, p. 119-127, May 1992.
- EPPIG, J. J. et al. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 4, p. 976-984, Apr. 1997.
- ESSAGHIR, A. et al. The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 16, p. 10334-10342, Apr. 2009.
- EVANS, W. H. Cell communication across gap junctions: a historical perspective and current developments. **Biochem Soc Trans**, v. 43, p. 450-459, 2015.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, Mar. 1998.
- FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA Translation and stability by microRNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 351-379, 2010.
- FAIR, T. et al. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v. 195, n. 4, p. 327-336, Apr. 1997.
- 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, p. 437-442, Dec. 1995.
- FAN, H. Y. et al. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 9, p. 2128-2140, Sept. 2008.
- FAN, Y. N. et al. miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W135-W141, July 2016.
- FAZI, F.; NERVI, C. MicroRN: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. **Cardiovascular Research**, v. 79, n. 4, p. 553-561, Sept. 2008.
- FENG, G. X. et al. Co-culture embedded in cumulus clumps promotes maturation of denuded oocytes and reconstructs gap junctions between oocytes and cumulus cells. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 231-237, Aug. 2013.

FENG, R. et al. MiRNA-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro. **Scientific Reports**, v. 5, Mar. 2015.

FENG, W. G. et al. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. **Theriogenology**, v. 67, n. 8, p. 1339-1350, May 2007.

FEUERSTEIN, P. et al. Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors. **Plos One**, v. 7, n. 7, July 2012.

FIEDLER, S. D. et al. Hormonal regulation of microRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1030-1037, Dec. 2008.

FRAGOULI, E.; LALIOTI, M. D.; WELLS, D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 1, p. 1-11, Jan.-Feb. 2014.

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

GARDAI, S. J. et al. Phosphorylation of bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21085-21095, 2004.

GEBREMEDHN, S. et al. MicroRNA expression profile in bovine granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle. **Plos One**, v. 10, n. 5, May 19 2015.

GEBREMEDHN, S. et al. MicroRNA-183-96-182 cluster regulates bovine granulosa cell proliferation and cell cycle transition by coordinately targeting FOXO1. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 6, art. 127, p. 1-11, June 2016.

GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, art. R80, 2004.

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. 159-177, Mar.-Apr. 2008.

GILCHRIST, R. B. et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 18, p. 3811-3821, Sept. 2006.

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.

GODE, F. et al. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, p. 2274-2278, June 2011.

GOOSSENS, K. et al. Regulatory microRNA network identification in bovine blastocyst development. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 13, p. 1907-1920, July 2013.

GONZALEZ-ROBAYNA, I.J. et al. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): Evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. **Molecular Endocrinology**, v. 14, p. 1283-1300, 2000.

GREENSEID, K. et al. Differential granulosa cell gene expression in young women with diminished ovarian reserve. **Reproductive Sciences**, v. 18, n. 9, p. 892-899, Sept. 2011.

GROSS, N.; KROPP, J.; KHATIB, H. MicroRNA signaling in embryo development. **Biology**, v. 6, n. 3, p. 34, 2017.

GUIGON, C. J.; MAGRE, S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 3, p. 450-458, Mar. 2006.

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 3, p. 608-616, Mar. 1997.

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

HALE, B. J. et al. Small RNAs: their possible roles in reproductive failure. **Male Role in Pregnancy Loss and Embryo Implantation Failure**, v. 868, p. 49-79, 2015.

HAN, J. et al. miR-223 reverses the resistance of EGFR-TKIs through IGF1R/PI3K/Akt signaling pathway. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 5, p. 1855-1867, May 2016.

HAN, R. H. et al. MiR-449a regulates autophagy to inhibit silica-induced pulmonary fibrosis through targeting Bcl2. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, n. 11, p. 1267-1279, Nov. 2016.

HAN, X. et al. MicroRNA-21 plays a pivotal role in the oocyte-secreted factor-induced suppression of cumulus cell apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 6, p. 1167-1180, June 2017.

HANNAFON, B. N.; DING, W. Q. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14240-14269, July 2013.

HANZELMANN, S.; CASTELO, R.; GUINNEY, J. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. **BMC Bioinformatics**, v. 14, Jan. 2013.

HARA, K. T. et al. Cyclin A2-CDK2 regulates embryonic gene activation in 1-cell mouse embryos. **Developmental Biology**, v. 286, n. 1, p. 102-113, Oct. 2005.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10-12, p. 819-831, 2012.

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

HOSSAIN, M. M. et al. Massive deregulation of miRNAs from nuclear reprogramming errors during trophoblast differentiation for placentogenesis in cloned pregnancy. **BMV Genomics**, v. 15, Jan. 2014.

HU, F. et al. MiR-218 induces neuronal differentiation of ASCs in a temporally sequential manner with fibroblast growth factor by regulation of the Wnt signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 7, Jan. 3 2017.

HUANG, K. et al. MiR-223 suppresses endometrial carcinoma cells proliferation by targeting IGF-1R. **American Journal of Translational Research**, v. 6, n. 6, p. 841-849, 2014.

HUNG, W.-T. et al. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 5, art. 117, p. 1-9, Nov. 2015.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v. 296, n. 2, p. 514-521, Aug. 2006.

HUTVAGNER, G. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 834-838, Aug. 2001.

JANOWSKI, D. et al. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 656-669, Aug. 2012.

JIA, C. Y. et al. MiR-223 suppresses cell proliferation by targeting IGF-1R. **Plos One**, v. 6, n. 11, Nov. 2011.

JOHNSTONE, R. M. et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation - association of plasma-membrane activities with released vesicles (exosomes). **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 19, p. 9412-9420, July 1987.

JOZWIK, M.; WOLCZYNSKI, S.; SZAMATOWICZ, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 409-413, May 1999.

KALRA, H. et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **Plos Biology**, v. 10, n. 12, Dec. 2012.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, Jan. 2000.

KANNIKE, K. et al. Forkhead transcription factor FOXO3a levels are increased in huntington disease because of overactivated positive autofeedback loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 47, p. 32845-32857, Nov. 2014.

KARAKAYA, C. et al. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 6, p. 1469-U132, June 2015.

KATZ-JAFFE, M. G. et al. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 939-946, Apr 2009.

KIDDER G. M; VANDERHYDEN B. C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 88, p. 399–413, 2010.

KIM, W. et al. miR-126 contributes to Parkinson's disease by dysregulating the insulin-like growth factor/phosphoinositide 3-kinase signaling. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 7, p. 1712-1721, July 2014.

KIM, Y. J. et al. MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 3050-3061, Nov. 2013.

KOKS, S. et al. The differential transcriptome and ontology profiles of floating and cumulus granulosa cells in stimulated human antral follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 229-240, Apr. 2010.

KONDRASHOV, N. et al. Ribosome-mediated specificity in hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 383-397, Apr. 2011.

KOPS, G. et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. **Nature**, v. 419, n. 6904, p. 316-321, Sept. 2002.

KORDUS, R. J.; LAVOIE, H. A. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. **Reproduction**, v. 153, n. 2, p. R69-R83, Feb. 2017.

KRISHER, R. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13 Supl., p. E14-E23, 2004.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, Vol 1, v. 1, p. 393-417, 2013.

KROL, J. et al. Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 618-631, May 2010.

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

KULIK, G.; KLIPPEL, A.; WEBER, M. J. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, p. 1595-1606, 1997.

LABRECQUE, R.; SIRARD, M. A. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 103-116, Feb. 2014.

LAI, K.; KILLINGSWORTH, M.; LEE, C. Gene of the month: PIK3CA. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, n. 4, p. 253-257, 2015.

LEDEE, N. et al. Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. **Human Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 406-413, Feb. 2013.

LEI, L. et al. The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1-2, p. 63-73, Feb. 2010.

LI, C. et al. MicroRNA-219-5p represses the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by targeting the LRH-1/Wnt/beta-Catenin signaling pathway. **Oncology Research**, v. 25, n. 4, p. 617-627, 2017.

LI, H.-Y. et al. MicroRNA-451 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via downregulation of Pi3k/Akt pathway. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 6, p. 3631-3634, 2013.

LI, H. J. et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1-3, p. 89-98, Aug. 2009.

LI, J. X.; MAO, G. K.; XIA, G. L. FSH modulates PKAI and GPR3 activities in mouse oocyte of COC in a gap junctional communication (GJC)-dependent manner to initiate meiotic resumption. **Plos One**, v. 7, n. 9, e37835, Sept. 2012.

LI, R. et al. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 839-845, Sept. 2000.

LI, Y. et al. MicroRNAs in ovarian function and disorders. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, art. 51, p. 1-8, Aug. 2015.

LI, Y.Z. et al. Insulin-like growth factor 1 promotes cumulus cell expansion and nuclear maturation of oocytes via Pi3K/Akt pathway. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 9, p. 11436-11443, 2016.

LINCOLN, A. J. et al. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. **Nature Genetics**, v. 30, n. 4, p. 446-449, Apr. 2002.

LINGENFELTER, B. M. et al. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, art. 40, p. 1-9, Mar. 2011.

LIU, L. H. et al. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. **Life Sciences**, v. 86, n. 5-6, p. 192-198, Jan. 2010.

LIU, N. N. et al. Comparison of follicular fluid amphiregulin and EGF concentrations in patients undergoing IVF with different stimulation protocols. **Endocrine**, v. 42, n. 3, p. 708-716, Dec. 2012.

LO CICERO, A.; STAHL, P. D.; RAPOSO, G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 35, p. 69-77, Aug. 2015.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in-vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48-53, Jan. 1994.

LONERGAN, P. et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 259-267, Aug. 2003.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1-21, 2014.

LUND, E. et al. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95-98, Jan. 2004.

MA, P.; SCHULTZ, R. M. HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation embryos: specificity versus compensation. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1119-1127, July 2016.

MACAULAY, A. D. et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, art. 90, p. 1-12, Oct. 2014.

MACAULAY, A. D. et al. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 1, art. 16, p. 1-11, Jan. 2016.

MACHADO, M. F. et al. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 202, n. 3, p. 347-353, Sept. 2009.

MACHTINGER, R.; LAURENT, L. C.; BACCARELLI, A. A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 2, p. 182-193, Mar.-Apr. 2016.

MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13375-13378, May 1998.

MAKKER, A.; GOEL, M. M.; MAHDI, A. A. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 53, p. 103-118, 2014.

MAMO, S. et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, art. 151, p. 1-14, Mar. 2011.

MANI, A. M. et al. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. **Reproduction**, v. 139, n. 1, p. 139-151, Jan. 2010.

MARX, D. et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. **Anticancer Research**, v. 17, n. 3C, p. 2233-2240, May-June 1997.

- MASYUK, A. I. et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 4, p. G990-G999, Oct. 2010.
- MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-1920, Sept. 2010.
- MATOBA, S. et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. **Reproduction Fertility and Development**, v. 26, n. 2, p. 337-345, 2014.
- MCBRIDE, D. et al. Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. **Reproduction**, v. 144, n. 2, p. 221-233, Aug. 2012.
- MCELROY, S. L. et al. Parthenogenic blastocysts derived from cumulus-free in vitro matured human oocytes. **Plos One**, v. 5, n. 6, June 2010.
- MCGINNIS, L. K.; LUENSE, L. J.; CHRISTENSON, L. K. MicroRNA in ovarian biology and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 9, Sept. 2015.
- MCLAUGHLIN, M. et al. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 8, p. 736-744, Aug. 2014.
- MEDVEDEV, S. et al. CDC2A (CDK1)-mediated phosphorylation of MSY2 triggers maternal mRNA degradation during mouse oocyte maturation. **Developmental Biology**, v. 321, n. 1, p. 205-215, Sept. 2008.
- MELLISHO, E. A. et al. Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. **Plos One**, v. 12, n. 5, art. e0178306, May 2017.
- MELO, E. O. et al. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Animal Genetics**, v. 48, n. 1, p. 19-29, Feb. 2017.
- MENDOZA, C. et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 1017-1022, Apr. 2002.
- MERMILLOD, P. et al. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 393-400, July 2008.
- MERMILLOD, P.; MARCHAL, R. La maturation de l'ovocyte de mammifères. **Médecine Sciences**, v. 15, n. 2, p.148-56, 1999.
- MILES, J. R. et al. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p. 16-26, Jan. 2012.
- MIYANO, T.; MANABE, N. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 63, p. 531-538, 2007.

MOLINARI, E. et al. Transcriptome analysis of human cumulus cells reveals hypoxia as the main determinant of follicular senescence. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, n. 8, p. 566-576, Aug. 2016.

MOUSSA, M. et al. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 11-27, Apr. 2015.

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

NAGARAJA, A. K. et al. Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 10, p. 2336-2352, Oct. 2008.

NAVAKANITWORAKUL, R. et al. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. **Scientific Reports**, v. 6, art. 25486, May 2016.

NEKOLA, M. V.; NALBANDO, A. V. Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 4, n. 2, p. 154-160, 1971.

NERI, C. Role and therapeutic potential of the pro-longevity factor FOXO and its regulators in neurodegenerative disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, art. 15, p. 1-8, 2012.

NERI, L. M. et al. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1584, p. 73-80, 2002.

NI, Y. G. et al. FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20517-20522, Dec. 2007.

NOFERESTI, S. S. et al. Controlled ovarian hyperstimulation induced changes in the expression of circulatory miRNA in bovine follicular fluid and blood plasma. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, art. 81, p. 1-16, Dec. 9 2015.

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

OGAWA, Y. et al. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 13-23, Jan. 2011.

OTSUKA, M. et al. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 5, p. 1944-1954, May 2008.

OZTURK, S.; SOZEN, B.; DEMIR, N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 1, p. 15-30, Jan. 2014.

PANT, S.; HILTON, H.; BURCZYNSKI, M. E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and

biomarker opportunities. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 11, p. 1484-1494, June 2012.

PARKS, J. C. et al. Corona cell RNA sequencing from individual oocytes revealed transcripts and pathways linked to euploid oocyte competence and live birth. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 32, n. 5, p. 518-526, May 2016.

PARK, H. J. et al. Ganglioside GM3 induces cumulus cell apoptosis through inhibition of epidermal growth factor receptor-mediated PI3K/AKT signaling pathways during in vitro maturation of pig oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, p. 702-711, 2017.

PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, n. 4, p. 14-26, 2014.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 27-37, Oct. 1998.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193-1210, Apr. 2001.

PITETTI, J.-L. et al. Insulin receptor and IGF1R are not required for oocyte growth, differentiation, and maturation in mice. **Sexual Development**, v. 3, n. 5, p. 264-272, 2009.

PLAKS, V. et al. Blastocyst implantation failure relates to impaired translational machinery gene expression. **Reproduction**, v. 148, n. 1, p. 87-98, July 2014.

PORTELA, V. M.; ZAMBERLAM, G.; PRICE, C. A. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 6, p. 2050-2055, Apr. 2010.

PUGAZHENTHI, S. et al. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 15, p. 10761-10766, Apr. 2000.

QU, P. X. et al. Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. **Plos One**, v. 12, n. 3, Mar. 2017.

RACZ, Z.; KAUCSAR, T.; HAMAR, P. The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs (review). **Acta Physiologica Hungarica**, v. 98, n. 3, p. 243-251, Sept. 2011.

RAISOVA, M. et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 2, p. 333-340, Aug. 2001.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373-383, Feb. 2013.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611-613, Feb. 2008.

REVELLI, A. et al. Oocyte polarized light microscopy, assay of specific follicular fluid metabolites, and gene expression in cumulus cells as different approaches to predict fertilization efficiency after ICSI. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, art. 47, p. 1-12, June 2017.

REVELLI, A. et al. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, art. 40, p. 1-13, May 2009.

RICHARD, F. J.; FORTIER, M. A.; SIRARD, M. A. Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with thecal cell monolayers. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 6, p. 1363-1369, June 1997.

RIENZI, L.; VAJTA, G.; UBALDI, F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 1, p. 34-45, Jan.-Feb. 2011.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, Feb. 2002.

ROSSI, V. et al. LH prevents cisplatin-induced apoptosis in oocytes and preserves female fertility in mouse. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, p.72-82, 2017.

SAAEELDIN, I. M. et al. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. **Cellular Reprogramming**, v. 16, n. 3, p. 223-234, June 2014.

SAAEELDIN, I. M.; OH, H. J.; LEE, B. C. Embryonic–maternal cross-talk via exosomes: potential implications. **Stem cells and cloning: advances and applications**, v. 8, p. 103-107, 2015.

SALILEW-WONDIM, D. et al. The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle. **Plos One**, v. 9, n. 9, art. e106795, Sept. 2014.

SANG, Q. et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 7, p. 3068-3079, July 2013.

SANGALLI, J. R. et al. Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic acid. **Plos One**, v. 9, n. 6, art. 101022, p. 1-10, June 2014.

SANTIQUET, N. W. et al. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 2, art. 86, p. 1-8, Aug. 2012.

SANTONOCITO, M. et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1751-U590, Dec. 2014.

SARAPIK, A. et al. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, art. 606459, p. 1-10, 2012.

SCANTLAND, S. et al. The adenosine salvage pathway as an alternative to mitochondrial production of ATP in maturing mammalian oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 3, art. 75, Sept. 2014.

SEN, A. et al. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 3008-3013, p. 1-11, Feb. 2014.

SHARMA, I.; SINGH, D. Conjugated linoleic acids attenuate FSH-and IGF1-stimulated cell proliferation; IGF1, GATA4, and aromatase expression; and estradiol-17 β production in buffalo granulosa cells involving PPAR γ , PTEN, and PI3K/Akt. **Reproduction**, v. 144, n. 3, p. 373-383, 2012.

SHEN, G. et al. MicroRNA-105 suppresses cell proliferation and inhibits PI3K/AKT signaling in human hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 12, p. 2748-2755, Dec. 2014.

SHIMADA, M.; TERADA, T. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells and oocytes is responsible for activation of oocyte mitogen-activated protein kinase during meiotic progression beyond the meiosis I stage in pigs. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1106-1114, 2001.

SHIMAZU, Tadahiro et al. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 211-214, Jan. 2013.

SIMPSON, R. J.; MATHIVANAN, S. Extracellular microvesicles: the need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. ii, 2012.

SINHA, P. B. et al. MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation. **Journal of Ovarian Research**, v. 10, art. 37, p. 1-18, June 2017.

SIRARD, M. A.; ASSIDI, M. Screening for oocyte competence. In: KRISHER, R. L. (Ed.) **Oocyte physiology and development in domestic animals**. New York: Wiley-Blackwell, 2013. p. 191–206.

SIRARD, M. A. et al. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reproduction (Cambridge), Supplement**, v. 69, p. 117-129, 2003.

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

SMYTH, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical Applications In Genetics And Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-25, 2004.

- SOHEL, M. M. H. et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **Plos One**, v. 8, n. 11, art. 78505, p. 1-16, Nov. 2013.
- SONTAKKE, S. D. et al. Characterization of microRNAs differentially expressed during bovine follicle development. **Reproduction**, v. 148, n. 3, p. 271-283, Sept. 2014.
- SUGIMURA, S. et al. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. **Scientific Reports**, v. 7, art. 6815, p. 1-14, July 2017.
- SUGIYAMA, R. et al. Bone morphogenetic protein 2 may be a good predictor of success in oocyte fertilization during assisted reproductive technology. **Human Cell**, v. 23, n. 3, p. 83-88, 2010.
- SUH, N. et al. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. **Current Biology**, v. 20, n. 3, p. 271-277, Feb. 2010.
- SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 685-695, Apr. 2010.
- TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. In: TURCHINOVICH, A.; CHO, W. (Ed.) **The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids**. S.I.: Frontiers e-books, 2014. p. 7-18.
- THOMPSON, J. G.; MOTTERSHEAD, D. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte secreted factors in domestic animals. In: KRISHER, R. L. (Ed.) **Oocyte physiology and development in domestic animals**. Oxford: Wiley, 2013. p. 55-70.
- TIAN, Y. et al. MicroRNA miR-451 downregulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 4, p. 1105-1112, 2012.
- TRIPURANI, S. K. et al. Cloning and analysis of fetal ovary microRNAs in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 16-22, July 2010.
- TROMBLY, D. J.; WOODRUFF, T. K.; MAYO, K. E. Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. **Endocrinology**, n. 150, p. 1014-1024, 2009.
- TWIGT, J. et al. Proteomic analysis of the microenvironment of developing oocytes. **Proteomics**, v. 12, n. 9, p. 1463-1471, May 2012.
- UCHIDA, F. et al. Overexpression of cell cycle regulator CDCA3 promotes oral cancer progression by enhancing cell proliferation with prevention of G1 phase arrest. **BMC Cancer**, v. 12, art. 321, p. 1-9, July 2012.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, H. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, Apr. 2005.

VANWEZEL, I. L. et al. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 133-140, Dec. 1995.

VILLARROYA-BELTRI, C. et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. **Nature Communications**, v. 4, art. 2980, p. 1-10, Dec. 2013.

VLASSOV, A. V. et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1820, n. 7, p. 940-948, July 2012.

WANG, L.-Q. et al. Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between the Notch and phosphatase and tensin homologue (PTEN)/AKT pathways. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 6, 2016.

WEBER, J. A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733-1741, Nov. 2010.

WEI, B. et al. MicroRNA-449a functions as a tumor-suppressor in gastric adenocarcinoma by targeting Bcl-2. **Oncology Letters**, v. 6, n. 6, p. 1713-1718, Dec. 2013.

WIGGLESWORTH, K. et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 39, p. E3723-E3729, Sept. 2013.

WU, L. M. et al. Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. **Plos One**, v. 7, n. 12, art. e52331, p. 1-8, Dec. 2012.

WU, L. L. et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5438-45, Nov 2010.

XIAO, G. H. et al. MiR-133b regulates the expression of the actin protein TAGLN2 during oocyte growth and maturation: a potential target for infertility therapy. **Plos One**, v. 9, n. 6, art. e100751, p. 1-9, June 2014.

XU, S. Y. et al. Micro-RNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase. **Endocrinology**, v. 152, n. 10, p. 3941-3951, Oct. 2011.

XU, M.; MO, Y. Y. The Akt-associated microRNAs. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3601-3612, 2012.

YAN, G. J. et al. MicroRNA-145 suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IB. **Febs Letters**, v. 586, n. 19, p. 3263-3270, Sept. 2012.

YANEZ-MO, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, art. 27066, 2015.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3-4, p. 159-169, Apr. 2002.

YANG, S. H. et al. Expression patterns and regulatory functions of micrnas during the initiation of primordial follicle development in the neonatal mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 5, art. 126, p. 1-11, Nov. 2013.

YANG, X. et al. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1438-1443, Jun 2012.

YAO, N. et al. A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 3239-3245, Jan. 2009.

YAO, N. et al. Follicle-stimulating hormone regulation of microRNA expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells. **Endocrine**, v. 38, n. 2, p. 158-166, Oct. 2010.

YAO, Y. L. et al. MiR-449a exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma by targeting Myc-associated zinc-finger protein. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 3, p. 640-656, Mar. 2015.

YENUGANTI, V. R. et al. The gene expression pattern induced by high plating density in cultured bovine and buffalo granulosa cells might be regulated by specific miRNA species. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 154-160, Apr. 2015.

YIN, M. M. et al. Transactivation of microRNA-320 by microRNA-383 regulates granulosa cell functions by targeting E2F1 and SF-1 proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 26, p. 18239-18257, June 2014.

YU, Y. H. et al. MiR-223 regulates human embryonic stem cell differentiation by targeting the IGF-1R/Akt signaling pathway. **Plos One**, v. 8, n. 11, art. e78769, p. 1-7, Nov. 2013.

YUAN, S. Q. et al. Murine follicular development requires oocyte DICER, but Not DROSHA. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 2, art. 39, p. 1-8, Aug. 2014.

ZHANG, M. J. et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of Natriuretic Peptide Receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4377-4385, Nov. 2011.

ZHENG W. et al. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, p. 24-30, 2012.

ZI, X.-D.; LU, J.-Y.; MA, L. Identification and comparative analysis of the ovarian microRNAs of prolific and non-prolific goats during the follicular phase using high-throughput sequencing. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1921, 2017.

ZIELAK-STECIWKO, A. E. et al. Expression of microRNAs and their target genes and pathways associated with ovarian follicle development in cattle. **Physiological Genomics**, v. 46, n. 19, p. 735-745, Oct. 2014.

ZUCCOTTI, M. et al. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 4, p. 525-540, July-Aug. 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequências dos primers fowards (senso) dos miRNAs utilizados no estudo 1 para o perfil de miRNAs da células da granulosa, complexos cumulus-oocitário, vesículas extracelulares liberadas por estas células e vesículas extracelulares do fluido folicular.

miRNA	Sequência do primer senso	miRNA	Sequência do primer senso
bta-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	bta-miR-31	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT
bta-let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	bta-miR-32	TATTGCACATGACTAAGTTGCAT
bta-let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	bta-miR-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA
bta-let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT	bta-miR-320b	AGCTGGGTTGAGAGGGTGGT
bta-let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT	bta-miR-323	GCACATTACACGGTCGACCTCT
bta-let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	bta-miR-324	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT
bta-let-7g	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	bta-miR-326	CCTCTGGGCCCTTCTCCAG
bta-let-7i	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	bta-miR-328	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGT
bta-miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	bta-miR-329a	AACACACCTGGTTAACCTTTTT
bta-let-7a-3p	CTATACAATCTACTGTCTTTC	bta-miR-329b	AGAGGTTTTCTGGGTTTTCTGTTT
bta-miR-100	AACCCGTAGATCCGAACCTTGTG	bta-miR-330	GCAAAGCACACGGCCTGCAGAGA
bta-miR-101	TACAGTACTGTGATAACTGAA	bta-miR-331-3p	GCCCCTGGGCCTATCCTAGAA
bta-miR-103	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA	bta-miR-331-5p	TCTAGGTATGGTCCAGG
bta-miR-105a	TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT	bta-miR-335	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT
bta-miR-105b	TCAAATGCTCAGACTCCTTGGT	bta-miR-338	TCCAGCATCAGTGATTTTGTGGA
bta-miR-106a	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTA	bta-miR-339a	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTCAC
bta-miR-106b	TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT	bta-miR-339b	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTC
bta-miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATC	bta-miR-33a	GTGCATTGTAGTTGCATTGCA
bta-miR-10a	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	bta-miR-33b	GTGCATTGCTGTTGCATTGC
bta-miR-10b	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	bta-miR-340	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGCC
bta-miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTGTTG	bta-miR-342	TCTCACACAGAAATCGCACCCATCT
bta-miR-124a	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG	bta-miR-345-3p	CCTGAACTAGGGGTCTGGAG
bta-miR-124b	TAAGGCACGCGGTGAATGCCAAG	bta-miR-345-5p	GCTGACTCCTAGTCCAGTGCT
bta-miR-125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG	bta-miR-346	TGTCTGCCCCGCATGCCTGCCTCT
bta-miR-125b	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	bta-miR-34a	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT
bta-miR-126-3p	CGTACCGTGAGTAATAATGCG	bta-miR-34b	AGGCAGTGTAAATTAGCTGATTG
bta-miR-126-5p	CATTATTACTTTTGGTACGCG	bta-miR-34c	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTG
bta-miR-127	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT	bta-miR-361	TTATCAGAATCTCCAGGGGTAC
bta-miR-128	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT	bta-miR-362-3p	AACACACCTATTCAAGGATTG
bta-miR-129	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCT	bta-miR-362-5p	AATCCTTGGAACCTAGGTGTGAGT
bta-miR-129-3p	AAGCCCTTACCCCAAAAAGCAT	bta-miR-363	ATTGCACGGTATCCATCTGCG
bta-miR-129-5p	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCT	bta-miR-365-3p	TAATGCCCTTAAAAATCCTTAT
bta-miR-130a	CAGTGCAATGTTAAAAGGGCAT	bta-miR-365-5p	AGGGACTTTTGGGGGCAGATGTG
bta-miR-130b	CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT	bta-miR-367	GAATTGCACCTTAGCAATGGTGA
bta-miR-132	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG	bta-miR-369-3p	AATAATACATGGTTGATCTTT
bta-miR-133a	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG	bta-miR-369-5p	ATCGACCGTGTATATTCGC
bta-miR-133b	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTA	bta-miR-370	GCCTGCTGGGGTGGAACTGGT
bta-miR-133c	ATTTGGTTCCATTTTACCAGC	bta-miR-371	AAGTGCCGCCATGTTTTGAGTGT
bta-miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGTGG	bta-miR-374a	TTATAATACAACCTGATAAGTG
bta-miR-135a	TATGGCTTTTTATTCTATGTGA	bta-miR-374b	ATATAATACAACCTGCTAAGTG
bta-miR-135b	TATGGCTTTTCATTCTATGTGA	bta-miR-375	TTTTGTTCGTTCCGGCTCGCGTGA
bta-miR-136	ACTCCATTTGTTTTGATGATGGA	bta-miR-376a	ATCATAGAGGAAAATCCACGT
bta-miR-137	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG	bta-miR-376b	ATCATAGAGGAAAATCCATGTT
bta-miR-138	AGCTGGTGGTTGTAATCAGGCCG	bta-miR-376c	GTGGATATTCCTTCTATGTTTA
bta-miR-139	TCTACAGTGCACGTGTCTCCAGT	bta-miR-376d	ATCATAGAGGAAAATCCACAT
bta-miR-140	TACCACAGGGTAGAACCACGGA	bta-miR-376e	AACATAGAGGAAAATCCACATT
bta-miR-141	TAACACTGTCTGGTAACAGATGG	bta-miR-377	ATCACACAAAGGCAACTTTTGT
bta-miR-142-3p	AGTGTTCCTACTTTATGGATG	bta-miR-378	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-142-5p	CATAAAGTAGAAAGCACTAC	bta-miR-378b	ACTTGACTTGGAGTCAGAAGGC
bta-miR-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCTCG	bta-miR-378c	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGT
bta-miR-144	TACAGTATAGATGATGTACTAG	bta-miR-379	TGGTAGACTATGGAACGTAGG
bta-miR-145	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT	bta-miR-380-3p	TATGTAATGTGGTCCACGTCT
bta-miR-146a	TGAGAACTGAATTCCATAGGTTGT	bta-miR-380-5p	TGGTTGACCATAGAACATGCGC

bta-miR-146b	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTGT	bta-miR-381	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
bta-miR-147	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA	bta-miR-382	GAAGTTGTTCTGTTGGATTTCG
bta-miR-148a	TCAGTGCACACAGAACTTTGT	bta-miR-383	AGATCAGAAGGTGATTGTGGCT
bta-miR-148b	TCAGTGCATCACAGAACTTTGT	bta-miR-409a	AGGTTACCCGAGCAACTTTGCAT
bta-miR-149-3p	GAGGGAGGGGACGGGGGCTGTGC	bta-miR-409b	GGGGTTCACCGAGCAACATTC
bta-miR-149-5p	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC	bta-miR-410	AATATAACACAGATGGCCTGT
bta-miR-150	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTGT	bta-miR-411a	ATAGTAGACCGTATAGCGTACG
bta-miR-151-3p	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG	bta-miR-411b	TGGTCGACCATAAAACGTACGT
bta-miR-151-5p	TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT	bta-miR-411c-3p	TGTATGTCAACTGATCCACAGT
bta-miR-152	TCAGTGCATGACAGAACTTGGG	bta-miR-411c-5p	GTTGATCAGAGAACATACATT
bta-miR-153	TTGCATAGTCACAAAAGTGATC	bta-miR-412	ACTTCACCTGGTCCACTAGCTGT
bta-miR-154a	TAGGTTATCCGTGTAGCCTTCG	bta-miR-421	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC
bta-miR-154b	AGAGGTCTTCCATGGTGCATTCCG	bta-miR-423-3p	AAGCTCGGTCTGAGGCCCTCAGT
bta-miR-154c	AGATATTGCACGGTTGATCTCT	bta-miR-423-5p	TGAGGGGCAGAGCGGAGACTTT
bta-miR-155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	bta-miR-424-3p	CAAAACGTGAGGCGCTGCTAT
bta-miR-15a	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	bta-miR-424-5p	CAGCAGCAATTCATGTTTTGA
bta-miR-15b	TAGCAGCACATCATGGTTTACA	bta-miR-425-3p	ATCGGGAATGTCGTGTCCGCC
bta-miR-16a	TAGCAGCACGTAAATATTGGTG	bta-miR-425-5p	ATGACACGATCACTCCCGTTGA
bta-miR-16b	TAGCAGCACGTAAATATTGGC	bta-miR-429	TAATACTGTCTGGTAATGCCGT
bta-miR-17-3p	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT	bta-miR-431	TGTCTTGCAGGCCGTGATGCAGG
bta-miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT	bta-miR-432	TCTTGGAGTAGGTGATTGGGTGG
bta-miR-181a	AACATTCAACGCTGTCCGTGAGTT	bta-miR-433	ATCATGATGGGCTCCTCGGTGT
bta-miR-181b	AACATTCAATTGCTGTCCGTGGGT	bta-miR-448	TTGCATATGTAGGATGTCCCAT
bta-miR-181c	AACATTCAACCTGTCCGTGAGTTT	bta-miR-449a	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT
bta-miR-181d	AACATTCAATTGTTGTCCGTGGGT	bta-miR-449b	AGGCAGTGTATTGTTAGCTGGC
bta-miR-182	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT	bta-miR-449c	AGGCAGTGCATCTCTAGCTGG
bta-miR-183	TATGGCACTGGTAGAATTCACCTG	bta-miR-449d	GAAGGCTGTGTGCTGTGGAG
bta-miR-184	TGGACGGAGAACTGATAAGGGT	bta-miR-450a	TTTTGCGATGTGTTCCCTAATAT
bta-miR-185	TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA	bta-miR-450b	TTTTGCAATATGTTCCCTGAATA
bta-miR-186	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT	bta-miR-451	AAACCGTTACCATTACTGAGTTT
bta-miR-187	TCGTGTCTTGTGTTGACGCCGG	bta-miR-452	TGTTTGACAGAGGAACTGAGAC
bta-miR-188	CATCCCTTGCATGGTGGAGGGT	bta-miR-453	AGGTTGTCCGTGGTGAGTTCGCA
bta-miR-18a	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATA	bta-miR-454	TAGTGCAATATTGCTTATAGGGT
bta-miR-18b	TAAGGTGCATCTAGTGCAGTTA	bta-miR-455-3p	GCAGTCCATGGGCATATACACT
bta-miR-190a	TGATATGTTTGATATATTAGGT	bta-miR-455-5p	TATGTGCCTTTGGACTACATC
bta-miR-190b	TGATATGTTTGATATTGGGT	bta-miR-483	TCACTCCTCTCCTCCCGTCTT
bta-miR-191	CAACGGAATCCCAAAAGCAGCTG	bta-miR-484	TCAGGCTCAGTCCCCTCCCGAT
bta-miR-192	CTGACCTATGAATTGACAGCCAG	bta-miR-485	AGAGGCTGGCCGTGATGAATTCCG
bta-miR-193a	GGGACTTTGTAGGCCAGTT	bta-miR-486	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAG
RNU 43 snoRNA	CTTATTGACGGGCGGACAGAAAC	bta-miR-487a	AATCATACAGGGACATCCAGT
RNU 1 snRNA	CGACTGCATAATTTGTGGTAGTGG	bta-miR-487b	AATCGTACAGGGTCACTCCACTT
bta-miR-99b	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG	bta-miR-488	TTGAAAGGCTGTTTCTTGGTC
bta-miR-193a-3p	AACTGGCCTACAAAGTCCAGT	bta-miR-489	GTGACATCACATATATGGCGAC
bta-miR-193a-5p	TGGGTCTTTGCGGGCGAGATGA	bta-miR-490	CAACCTGGAGGACTCCATGCTG
bta-miR-193b	AACTGGCCCACAAAGTCCCGCTTT	bta-miR-491	AGTGGGGAACCCCTTCCATGAGG
bta-miR-194	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA	bta-miR-493	TGAAGGTCTACTGTGTGCCAGG
bta-miR-195	TAGCAGCACAGAAATATTGGCA	bta-miR-494	TGAAACATACACGGGAAACCTC
bta-miR-196a	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	bta-miR-495	AAACAAACATGGTGCACCTTCTT
bta-miR-196b	TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGGA	bta-miR-496	TGAGTATTACATGGCCAATCTC
bta-miR-197	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC	bta-miR-497	CAGCAGCACACTGTGGTTTGT
bta-miR-199a-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA	bta-miR-499	TTAAGACTTGCAGTGATGTTT
bta-miR-199a-5p	CCCAGTGTTTCACTACCTGTT	bta-miR-500	TAATCCTTGCTACCTGGGTGAGA
bta-miR-199b	CCCAGTGTTTCACTATCTGTTC	bta-miR-502a	AATGCACCTGGGCAAGGATTCA
bta-miR-199c	TACAGTAGTCTGCACATTGG	bta-miR-502b	AATCCACCTGGGCAAGGATTTC
bta-miR-19a	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA	bta-miR-503-3p	GGAGTATTGTTTCTGCTGCCCGG
bta-miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAACTGA	bta-miR-503-5p	TAGCAGCGGGAACAGTACTG
bta-miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGTT	bta-miR-504	AGACCCTGGTCTGCACTCTGTC
bta-miR-200b	TAATACTGCCTGGTAATGATG	bta-miR-505	CGTCAACACTTGCTGGTTTCTT
bta-miR-200c	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA	bta-miR-532	CATGCCCTTGAGTGTAGGACCGT
bta-miR-202	TTCCTATGCATATACTTCTTT	bta-miR-539	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGT
bta-miR-204	TTCCCTTTGTATCCTATGCCT	bta-miR-541	TGGTGGGCACAGAATCCGGCCCT
bta-miR-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG	bta-miR-542-5p	TCGGGGATCATCATGTACAGAG

bta-miR-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG	bta-miR-543	AAACATTCGCGGTGCACTTCTT
bta-miR-208a	ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT	bta-miR-544a	ATTCTGCATTTTTAGCAAGTTC
bta-miR-208b	ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT	bta-miR-544b	ATTCTGCATTTCTAACAAGTTC
bta-miR-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	bta-miR-545-3p	ATCAACAAACATTATTGTGTG
bta-miR-20b	CAAAGTGCTCACAGTGCAGGTA	bta-miR-545-5p	TCAGTAAATGTTTATTGGATG
bta-miR-21-3p	AACAGCAGTCGATGGGCTGTCT	bta-miR-551a	GCGACCCAATCTTGGTTTCCA
bta-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGACT	bta-miR-551b	GGCGACCCATACTTGGTTTCAG
bta-miR-210	ACTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA	bta-miR-562	AAAGCAGCTGTACCATTAC
bta-miR-211	TTCCCTTTGTCATCCTTTGCC	bta-miR-568	ATGTATAAATGTATACACAC
bta-miR-212	ACCTTGGCTCTAGACTGCTTACT	bta-miR-574	TGAGTGTGTGTGTGTGAGTGTGTG
bta-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT	bta-miR-582	TTACAGTTGTTCAACCAGTTACT
bta-miR-215	ATGACCTATGAATTGACAGACA	bta-miR-584	TGGTTTGCCTGGGACTGAG
bta-miR-216a	TAATCTCAGCTGGCAACTGTGA	bta-miR-592	ATTGTGTCAATATGCGATGATGT
bta-miR-216b	AAATCTCTGCAGGCAAATGTGA	bta-miR-599	GTTGTGTCAGTTTATCAAAC
bta-miR-217	TACTGCATCAGGAACTGATTGGAT	bta-miR-615	GGGGGTCCCCGGTGCTCGGATC
bta-miR-218	TTGTGCTTGATCTAACCATGTG	bta-miR-628	ATGCTGACATATTTACTAGAGG
bta-miR-219	AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG	bta-miR-631	AGACCTGGCTTAGACCTCAGC
bta-miR-219-3p	AGAATTGTGGCTGGACATCTG	bta-miR-652	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG
bta-miR-219-5p	TGATTGTCCAAACGCAATTCTT	bta-miR-653	GTGTTGAAACAATCTCTGTTG
bta-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTG	bta-miR-654	TATGTCTGCTGACCATCACCTT
bta-miR-22-5p	AGTTCTTCAGTGGCAAGCTTTA	bta-miR-655	ATAATACATGGTTAACCTCTCT
bta-miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT	bta-miR-656	AATATTATACAGTCAACCTCT
bta-miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGT	bta-miR-658	GGCGGAGGGAAGCGGGTCCGTTGGT
bta-miR-223	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCA	bta-miR-660	TACCCATTGCATATCGGAGCTG
bta-miR-224	CAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTA	bta-miR-664	CAGGCTGGGGTGTGTGTGGATG
bta-miR-23a	ATCACATTGCCAGGGATTTC	bta-miR-664b	TATTCATTTATCTCCCAGCCTAC
bta-miR-23b-3p	ATCACATTGCCAGGGATTACCAC	bta-miR-665	ACCAGTAGGCCGAGGCCCT
bta-miR-23b-5p	GGGTTCCCTGGCATGCTGATTT	bta-miR-669	TGTGGGTGTGTGCATGTGCGTG
bta-miR-24	GTGCCTACTGAGCTGATATCAGT	bta-miR-670	TCCCTGAGTATATGTGGTGAA
bta-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG	bta-miR-671	AGGAAGCCCTGGAGGGCTGGAG
bta-miR-25	CATTGCAGTTGTCTCGGTCTGA	bta-miR-677	CTCACTGATGAGCAGCTTCTGAC
bta-miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	bta-miR-7	TGGAAGACTAGTGATTTTGTGTT
bta-miR-26b	TTCAAGTAATTCAGGATAGGTT	bta-miR-708	AAGGAGCTTACAATCTAGCTGGG
bta-miR-26c	AGCCTATCCTGGATTACTTGAA	bta-miR-744	TGCGGGGCTAGGGCTAACAGCA
bta-miR-27a-3p	TTACAGTGCTAAGTTCCG	bta-miR-758	TTTGTGACCTGGTCCACTAACC
bta-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCA	bta-miR-759	GCAGACTGCAAACAATTTTGAC
bta-miR-27b	TTACAGTGCTAAGTTCTGC	bta-miR-760-3p	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGA
bta-miR-28	AAGGAGCTCACAGTCTATTGAG	bta-miR-760-5p	CCCCTCAGTCCACCAGAGCCCG
bta-miR-296-3p	GAGGGTTGGGCGGAGGCTTTCC	bta-miR-761	GCAGCAGGGTGAAACTGACACA
bta-miR-296-5p	GAGGGCCCCCCCCAATCCT	bta-miR-763	CCAGCTGGGAGGAACCAGTGCC
bta-miR-299	TGGTTTACCGTCCCACATACAT	bta-miR-764	GGTGCTCACTCGTCCTTCT
bta-miR-29a	CTAGCACCATCTGAAATCGGTTA	bta-miR-767	TGCACCATGGTTGTCTGAGCATG
bta-miR-29b	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT	bta-miR-769	TGAGACCTCCGGTTCTGAGCT
bta-miR-29c	TAGCACCATTTGAAATCGGTTA	bta-miR-873	GCAGGAAGTGTGAGTCTCCT
bta-miR-29d-3p	TAGCACCATTTGAAATCGATTA	bta-miR-874	CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGA
bta-miR-29d-5p	TGACCGATTCTCCTGGTGTT	bta-miR-875	TATACCTCAGTTTATCAGGTG
bta-miR-29e	TAGCATCATTTGAAATCAGTGTTT	bta-miR-876	TGGATTTCTTTGTGAATCACCA
bta-miR-301a	CAGTGCAATAGTATTGTCAAAGCAT	bta-miR-877	GTAGAGGAGATGGCGAGGG
bta-miR-301b	CAGTGCAATGATATTGTCAAAGCAT	bta-miR-885	TCCATTACACTACCCTGCCTCT
bta-miR-302a	AAGTGCTTCCATGTTTTAGTGA	bta-miR-9-3p	ATAAAGCTAGATAACCG
bta-miR-302b	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGTAG	bta-miR-9-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG
bta-miR-302c	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG	bta-miR-92a	TATTGCACTTGTCGCGCCTGT
bta-miR-302d	TAAGTGCTTCCATGTTTTAGT	bta-miR-92b	TATTGCACTCGTCCCGGCCTCC
bta-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT	bta-miR-93	CAAAGTGCTGTTCTGTCAGGTA
bta-miR-30b-3p	CTGGGAGGTGGATGTTTACTT	bta-miR-935	CCAGTTACCGCTTCCGCTACCGC
bta-miR-30b-5p	TGTAAACATCCTACACTCAGCT	bta-miR-940	AAGGCTGGGCCCGCTCCGC
bta-miR-30c	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC	bta-miR-95	TTCAACGGGTATTTATTGAGCA
bta-miR-30d	TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT	bta-miR-96	TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT
bta-miR-30e-5p	TGTAAACATCCTTGACTGGAAGCT	bta-miR-98	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
bta-miR-30f	TGTAAACACCCTACACTCTCAGCT	bta-miR-99a-3p	CAAGCTCGCTTCTATGGGT
		bta-miR-99a-5p	AACCCGTAGATCCGATCTTGT

APÊNDICE B – Similaridade entre os miRNAs maduros bovinos com os miRNAs maduros humanos.

miRNAs exclusivos das CGs				
%	miRNA Bovino	Sequência Bovina	miRNA Humano	Sequência Humana
95.65	bta-miR-367	GAATTGCACTTTAGCAATGGTGA	hsa-mir-367-3p	AATTGCACTTTAGCAATGGTGA
100	bta-miR-449a	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT	hsa-mir-449a	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT
95.65	bta-miR-451	AAACCGTTACCATTACTGAGTTT	hsa-mir-451a	AAACCGTTACCATTACTGAGTT
100	bta-miR-539	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGT	hsa-mir-539-5p	GGAGAAATTATCCTTGGTGTGT
100	bta-miR-543	AAACATTCGCGGTGCACTTCTT	hsa-mir-543	AAACATTCGCGGTGCACTTCTT
90.47	bta-miR-653	GTGTTGAAACAATCTCT GTTG	hsa-mir-653-5p	GTGTTGAAACAATCTCT ACTG
95.45	bta-miR-759	GCAGACTGCAAACAATTTTGAC	hsa-mir-759	GCAG AGT GCAAACAATTTTGAC
100	bta-miR-875	TATACCTCAGTTTTATCAGGTG	hsa-mir-875-5p	TATACCTCAGTTTTATCAGGTG
miRNAs exclusivos das COCs				
%	miRNA	Sequência Bovina	miRNA Humano	Sequência Humana
100	bta-miR-105a	TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT	hsa-mir-105-5p	TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT
95.45	bta-miR-126-3p	CGTACCGTGAGTAATAATGCG	hsa-miR-126-3p	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG
100	bta-miR-137	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG	hsa-miR-137	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG
81.81	bta-miR-142-3p	AGT GTTTCCTACTTTATGGAT G	hsa-miR-142-3p	TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA
95.65	bta-miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGTT	hsa-mir-200a-3p	TAACACTGTCTGGTAACGATGT
95.45	bta-miR-218	TTGTGCTTGATCTAACCATGT G	hsa-mir-218-5p	TTGTGCTTGATCTAACCATGT
95.45	bta-miR-219-5p	TGATTGTCCAAACGCAATTCTT	hsa-mir-219a-5p	TGATTGTCCAAACGCAATTCT
95.45	bta-miR-329a	AACACACCTGGTTAACCTTTTT	hsa-mir-329-3p	AACACACCTGGTTAACCT CTTT
95.65	bta-miR-329b	AGAGG TTTTCTGGGTTTCTGTTT	hsa-mir-329-5p	GAGGTTTTCTGGGTTTCTGTTT C
100	bta-miR-365-5p	AGGGACTTTTGGGGGCAGATGTG	hsa-mir-365a-5p	AGGGACTTTTGGGGGCAGATGTG
90.90	bta-miR-369-5p	ATCGACCGTGTTATATTCGC	hsa-mir-369-5p	AGAT CGACCGTGTTATATTCGC
95.65	bta-miR-371	AAGTGCCGCCAT G TTTTGAGTGT	hsa-mir-371a-3p	AAGTGCCGCCAT C TTTTGAGTGT
100	bta-miR-374b	ATATAATACAACCTGCTAAGTG	hsa-mir-374b-5p	ATATAATACAACCTGCTAAGTG
100	bta-miR-495	AAACAAACATGGTGCACTTCTT	hsa-mir-495-3p	AAACAAACATGGTGCACTTCTT
-	bta-miR-544b	ATTCTGCATTCTTAACAAGTTC	Não encontrado	
90	bta-miR-562	AAAGCAGCTGTACCATT TAC	hsa-mir-562	AAAGTAGCTGTACCATT GC
miRNAs exclusivos das CG-VEs				
%	miRNA	Sequência Bovina	miRNA Humano	Sequência Humana
100	bta-miR-125b	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA
100	bta-miR-130b	CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT	hsa-miR-130b-3p	CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT
100	bta-miR-132	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG	hsa-miR-132-3p	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG
95.45	bta-miR-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCT C G	hsa-miR-143-3p	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC
69.56	bta-miR-154b	AGAGG CTTCCATGGTGCATT CG	hsa-miR-154-5p	TAGGTTATCCGTGTTGCCT TCG
100	bta-miR-155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	hsa-miR-155-5p	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT
100	bta-miR-197	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC	hsa-miR-197-3p	TTCACCACCTTCTCCACCCAGC
100	bta-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCA	hsa-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCA
95.45	bta-miR-29d-5p	TGACCGATTTCTCCTGGTGTT	hsa-miR-29c-5p	TGACCGATTTCTCCTGGTGTT C
100	bta-miR-370	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT	hsa-miR-370-3p	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT
90.90	bta-miR-502b	AAT C CACCTGGGCAAGGATT C	hsa-miR-502-3p	AAT GC CACCTGGGCAAGGATT CA
100	bta-miR-760-3p	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGA	hsa-miR-760	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGA
100	bta-miR-885	TCCATTACACTACCCTGCCTCT	hsa-miR-885-5p	TCCATTACACTACCCTGCCTCT
miRNAs exclusivos das COC-VEs				
%	miRNA	Sequência Bovina	miRNA Humano	Sequência Humana
95.45	bta-let-7e	TGAGGTAGGAGTTGTATAGT	hsa-let-7e-5p	TGAGGTAGGAGTTGTATAGTT
100	bta-let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	hsa-let-7f-5p	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
100	bta-let-7i	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	hsa-let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
100	bta-miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	hsa-miR-1-3p	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT
100	bta-miR-100	AACCCGTAGATCCGAACCTGTG	hsa-miR-100-5p	AACCCGTAGATCCGAACCTGTG
100	bta-miR-101	TACAGTACTGTGATAACTGAA	hsa-miR-101-3p	TACAGTACTGTGATAACTGAA
95.65	bta-miR-106a	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTA	hsa-miR-106a-5p	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTA G
86.95	bta-miR-124b	TAAGGCACGCGGTGAATGCC AAG	hsa-miR-124-3p	TAAGGCACGCGGTGAATGCC
95.83	bta-miR-125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTG	hsa-miR-125a-5p	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGT GA
95.45	bta-miR-129	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCT	hsa-miR-129-5p	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTG C
100	bta-miR-133a	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG	hsa-miR-133a-3p	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG
100	bta-miR-145	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT	hsa-miR-145-5p	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT
95.45	bta-miR-149-3p	GAGGG AGGGACGGGGGCTGTGC	hsa-miR-149-3p	AGGGAGGGACGGGGGCTGTGC
100	bta-miR-149-5p	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC	hsa-miR-149-5p	TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC

95.45	bta-miR-15a	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	hsa-miR-15a-5p	TAGCAGCACATAATGGTTTGT G
95.45	bta-miR-16b	TAGCAGCACGTAAATATTGGC	hsa-miR-16-5p	TAGCAGCACGTAAATATTGGC G
100	bta-miR-187	TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCGG	hsa-miR-187-3p	TCGTGTCTTGTGTTGCAGCCGG
95.65	bta-miR-210	ACT GTGCGTGTGACAGCGGCTGA	hsa-miR-210-3p	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA
100	bta-miR-25	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA	hsa-miR-25-3p	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
100	bta-miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	hsa-miR-26a-5p	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
100	bta-miR-30c	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC	hsa-miR-30c-5p	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC
86,95	bta-miR-339b	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTC	hsa-miR-339-5p	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTC ACG
100	bta-miR-346	TGTCTGCCCCGCATGCCTGCCTCT	hsa-miR-346	TGTCTGCCCCGCATGCCTGCCTCT
77.27	bta-miR-378b	ACTTGACTTGGAGTCAGAA GGC	hsa-miR-378b	ACT GG ACTTGGAG GC AGAA
100	bta-miR-425-3p	ATCGGGAATGTCGTGTCCGCC	hsa-miR-425-3p	ATCGGGAATGTCGTGTCCGCC
100	bta-miR-453	AGGTTGTCCGTGGTGAGTTCGCA	hsa-miR-323b-5p	AGGTTGTCCGTGGTGAGTTCGCA
90	bta-miR-665	ACCAGTAGGCC CG AGGCCCT	hsa-miR-665	ACCAG G AGGCTGAGGCCCT
100	bta-miR-874	CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGA	hsa-miR-874-3p	CTGCCCTGGCCCGAGGGACCGA
100	bta-miR-877	GTAGAGGAGATGGCGCAGGG	hsa-miR-877-5p	GTAGAGGAGATGGCGCAGGG
90.47	bta-miR-940	AAGGCTGGGCC CCCCG CTCC GC	hsa-miR-940	AAGGC AGGG CCCCCGCTCC CC

APÊNDICE C – Sequências dos primers fowards (senso) dos miRNAs utilizados no estudo 3.

miRNA	Sequência do primer senso	miRNA	Sequência do primer senso
bta-miR-1179	AAGCATTCTTTCATTGGTTGG	bta-miR-1282	TCGTTTGCCTTTTTCTGCTT
bta-miR-1185	AGAGGATACCCTTTGTATGTT	bta-miR-1284	TCTGCACAGACCCTGGCTTTTC
bta-miR-1193	TAGGTCACCCGTTTGACTATC	bta-miR-1287	TGCTGGATCAGTGGTTTGAGTC
bta-miR-1197	TAGGACACATGGTCTACTTCT	bta-miR-1291	TGGCCCTGACTGAAGACCTGCAGT
bta-miR-1224	GTGAGGACTCGGGAGGTGGAG	bta-miR-1296	TTAGGGCCCTGGCTCCATCTCC
bta-miR-1225-3p	CCGAGCCCCTGTGCCGCCCCAG	bta-miR-1298	TTCATTCGGCTGTCCAGATGTA
bta-miR-1246	AATGGATTTTTGGAGCAGG	bta-miR-1301	TTGCAGCTGCCTAGGAGTGATTC
bta-miR-1247-3p	CGGGAACGTCCGGAGTGGAGC	bta-miR-1306	CCACCTCCCCTGCAAACGTCC
bta-miR-1247-5p	ACCCGTCCCGTTCGTCCCGGA	bta-miR-1307	ACTCGGCGTGGCGTCGGTCGTG
bta-miR-1248	ACCTTCTTGATAAGCACTGTGCTAAA	bta-miR-1343-3p	CTCCTGGGGCCCGCACTCTC
bta-miR-1249	ACGCCCTTCCCCCCTTCTTCA	bta-miR-1343-5p	TGGGGAGCGCCCCCGGGCGGG
bta-miR-1260b	ATCCCACCACTGCCACCA	bta-miR-1388-3p	ATCTCAGGTTTGTACGCCCGCA
bta-miR-1271	CTTGGCACCTAGTAAGTACTCA	bta-miR-3064	TTGCCACACTGCAACACCTTACA
bta-miR-1277	TACGTAGATATATATGTATTTT	bta-miR-378d	CTGGACTTGGAGTCAGAAGACC
bta-miR-1281	TCGCCTCCTCCTCTCCC	bta-miR-4523	GACCGAGAGGGCCTCGGCTGT

APÊNDICE D – Lista completa dos genes analisados por microfluídica no estudo 4.

Símbolo do gene	Nome
ACACA	Acetyl-CoA Carboxylase Alpha
ACTB	Actin Beta
ADCY3	Adenylate Cyclase 3
ADCY6	Adenylate Cyclase 6
ADCY9	Adenylate Cyclase 9
AGPAT1	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 1
AGPAT9	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 9
AKR1B1	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member B10
AREG	Amphiregulin
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATP5L	ATP Synthase, H ⁺ Transporting, Mitochondrial Fo Complex Subunit G
BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
BCL2	BCL2, Apoptosis Regulator
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist
BMP15	Bone Morphogenetic Protein 15
CASP3	Caspase 3, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
CASP9	Caspase 9
CAT	Catalase
CD36	CD36 Molecule
CLIC3	Chloride Intracellular Channel 3
CPT1B	Carnitine Palmitoyltransferase 1B
CPT2	Carnitine Palmitoyltransferase 2
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3
DGAT1	Diacylglycerol O-Acyltransferase 1
DICER1	Dicer 1, Ribonuclease III
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FASN	Fatty Acid Synthase
FDX1	Ferredoxin 1
FOXO3	Forkhead Box O3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GATM	Glycine Amidinotransferase
GFPT2	Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 2
GLRX2	Glutaredoxin 2
GPX1	Glutathione Peroxidase 1
GPX4	Glutathione Peroxidase 4
GREM1	Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist
GUCY1B3	Guanylate Cyclase 1 Soluble Subunit Beta
H2AFZ	H2A Histone Family, Member Z
H3F3A	H3 Histone, Family 3A
HAS2	Hyaluronan Synthase 2
HDAC2	Histone Deacetylase 2
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthase
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HSPA1A	Heat Shock 70kda Protein 1A
HSPA5	Heat Shock Protein Family A Member 5
IGF1R	Insulin Like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP2	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2
IGFBP4	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4
IMPDH1	Inosine Monophosphate Dehydrogenase 1
IMPDH2	Inosine Monophosphate Dehydrogenase 2
KRT8	Keratin 8
LIPE	Lipase, Hormone-Sensitive
LPL	Lipoprotein Lipase
LUM	Lumican
MTIF3	Mitochondrial Translational Initiation Factor 3

NDUFA1	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A1
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2
NOS3	Nitric Oxide Synthase 3
NPPC	Natriuretic Peptide C
NPR1	Natriuretic Peptide Receptor 1
NPR2	Natriuretic Peptide Receptor B/Guanylate Cyclase B
NPR3	Natriuretic Peptide Receptor 3
OOSP1	Oocyte Secreted Protein 1, Pseudogene
PDE5A	Phosphodiesterase 5A, Cgmp-Specific
PFKP	Phosphofructokinase, Platelet
PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1
PLIN2	Perilipin 2
PLIN3	Perilipin 3
PNPLA2	Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PRDX1	Peroxiredoxin 1
PRDX3	Peroxiredoxin 3
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
PTX3	Pentraxin 3
RPLPO	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
RPL15	Ribosomal Protein L15
RPS25	Ribosomal Protein S25
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1
SLC2A4	Solute Carrier Family 2 Member 4
SOD1	Superoxide Dismutase 1, Soluble
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TFAM	Transcription Factor A, Mitochondrial
TNFAIP6	TNF Alpha Induced Protein 6
TXNRD1	Thioredoxin Reductase 1
VCAN	Versican
VNN1	Vanin 1
XBP1	X-Box Binding Protein 1

APÊNDICE E – Lista completa dos miRNAs identificados nas células da granulosa (CG) e nos complexos cumulus-oócito (COC) em bovinos, com os valores médios de Ct e desvios padrão.

miRNAs	CG		COC	
	Ct	DP	Ct	DP
bta-let-7a-5p	26.5521	± 4.9723	23.5286	± 2.2606
bta-let-7b	25.3437	± 2.9996	22.4912	± 0.9469
bta-let-7c	25.0129	± 3.4400	24.8710	± 2.9286
bta-let-7d	26.2246	± 3.8892	24.5084	± 2.2301
bta-let-7e	25.0259	± 4.2428	23.5749	± 2.9466
bta-let-7f	27.6195	± 6.8816	24.8494	± 2.4821
bta-let-7g	27.7269	± 4.8887	26.3187	± 2.0604
bta-let-7i	27.2875	± 5.6339	25.0429	± 1.6775
bta-let-7a-3p	30.8417	± 4.5591	27.6778	± 1.4116
bta-miR-100	27.6801	± 5.1974	25.3676	± 1.5444
bta-miR-101	31.0284	± 4.5269	29.8598	± 1.8040
bta-miR-103	26.9028	± 4.3723	24.9455	± 1.0170
bta-miR-105a			30.5823	± 1.6421
bta-miR-105b	30.8129	± 3.6446	29.3708	± 1.1716
bta-miR-106a	25.7332	± 4.4094	24.3681	± 0.9977
bta-miR-106b	28.0359	± 3.7366	26.1519	± 0.2552
bta-miR-107	29.7118	± 4.9504	28.7233	± 1.1078
bta-miR-10a	31.1195	± 5.3748	27.5693	± 1.9264
bta-miR-10b	27.2564	± 0.3740	27.9206	± 0.8962
bta-miR-122	30.1076	± 1.2885	30.9975	± 0.1628
bta-miR-124a	30.2169	± 0.3610	30.7094	± 1.3767
bta-miR-124b	32.3579	± 3.8025	31.2378	± 2.3075
bta-miR-125a	24.6520	± 2.6072	22.6021	± 2.0521
bta-miR-125b	25.7653	± 2.9680	24.2415	± 0.9566
bta-miR-126-3p			30.3539	± 3.0889
bta-miR-126-5p	31.1378	± 0.0815	30.5996	± 1.9002
bta-miR-127	27.2159	± 4.6860	24.3934	± 1.5349
bta-miR-128	29.7219	± 3.7232	26.9072	± 0.7986
bta-miR-129	30.9359	± 4.1538	27.8745	± 1.5398
bta-miR-129-3p	32.9912	± 1.8424	31.4473	± 1.9898
bta-miR-129-5p	30.4343	± 3.3768	28.3122	± 0.5543
bta-miR-130a	29.3764	± 4.4551	27.0202	± 0.9234
bta-miR-130b	25.0572	± 0.9971	23.9405	± 1.1883
bta-miR-132	27.8604	± 1.8425	27.9151	± 1.2059
bta-miR-133a	31.1643	± 3.7592	28.8595	± 1.9402
bta-miR-133b	33.1769	± 0.4075	33.2949	± 2.6579
bta-miR-133c	34.5269	± 1.9795	34.5846	± 2.3990
bta-miR-134	31.1443	± 1.4397	30.5042	± 2.3008
bta-miR-135a	33.5871	± 0.0759	33.5944	± 0.7775
bta-miR-135b	36.2894	± 0.7207	35.5513	± 1.2548
bta-miR-136	35.0856	± 1.6740	32.3261	± 0.2087
bta-miR-137			35.1520	± 2.4311
bta-miR-138	29.5703	± 4.0523	26.3491	± 2.7093
bta-miR-139	32.9420	± 1.9919	31.1482	± 1.1771
bta-miR-140	28.7547	± 2.6349	27.3178	± 1.2211
bta-miR-141	33.8292	± 1.5059	32.1906	± 1.1617
bta-miR-142-3p			34.7013	± 0.9237
bta-miR-142-5p	33.9068	± 0.0602	33.7960	± 1.5196
bta-miR-143	30.4160	± 0.7550	30.7359	± 1.2134
bta-miR-145	28.8679	± 0.5587	26.5902	± 1.4483
bta-miR-146a	32.7743	± 2.4150	32.0605	± 1.1163
bta-miR-146b	31.8281	± 2.4830	31.6472	± 0.4921
bta-miR-147	31.7709	± 0.2087	31.6927	± 1.2884
bta-miR-148a	27.8147	± 3.8432	26.0998	± 0.5319

bta-miR-148b	27.8375	±	3.3808	25.9418	±	0.7656
bta-miR-149-3p	23.3887	±	4.1706	21.6288	±	2.3306
bta-miR-149-5p	29.0602	±	3.0207	25.7559	±	2.3202
bta-miR-150	35.0491	±	0.0852	33.0779	±	1.6530
bta-miR-151-3p	29.0198	±	4.6442	25.9584	±	1.2918
bta-miR-151-5p	25.4890	±	2.2797	24.6849	±	0.7869
bta-miR-152	31.3752	±	3.0700	28.6287	±	1.9983
bta-miR-153	32.3133	±	0.1781	33.0887	±	1.9794
bta-miR-154a	32.7424	±	0.5124	32.9687	±	1.9731
bta-miR-154b	33.5138	±	1.3835	31.1560	±	1.4338
bta-miR-154c	34.1386	±	0.3481	31.8839	±	2.2158
bta-miR-155	24.0956	±	3.3046	25.0608	±	2.3316
bta-miR-15a	27.4248	±	6.4060	23.8672	±	1.0251
bta-miR-15b	26.6710	±	2.9195	24.1569	±	1.0669
bta-miR-16a	27.7716	±	6.8637	23.2796	±	2.7473
bta-miR-16b	25.4114	±	5.5198	22.2188	±	3.3900
bta-miR-17-3p	29.9321	±	3.0413	28.8358	±	0.9615
bta-miR-17-5p	28.3064	±	4.8101	26.0477	±	1.9631
bta-miR-181a	26.7912	±	2.1484	26.6470	±	1.1169
bta-miR-181b	26.6773	±	2.3461	26.9406	±	0.8884
bta-miR-181c	29.2717	±	3.2289	29.4606	±	0.2271
bta-miR-181d	27.0788	±	2.2913	27.1490	±	1.2247
bta-miR-182	28.7436	±	3.1674	28.9879	±	1.1828
bta-miR-183	29.3263	±	2.2496	29.8402	±	1.1878
bta-miR-185	29.9769	±	3.6857	28.4284	±	0.5831
bta-miR-186	26.0994	±	2.4562	24.9963	±	1.2038
bta-miR-187	30.1215	±	5.1459	26.3114	±	2.6924
bta-miR-188	28.6761	±	0.9702	29.0027	±	1.9377
bta-miR-18a	30.5937	±	6.1171	27.6541	±	0.7465
bta-miR-18b	28.3954	±	0.2666	29.1201	±	1.3100
bta-miR-190a	33.3491	±	0.5191	34.1846	±	1.2541
bta-miR-190b	34.8812	±	2.6467	32.1955	±	0.9981
bta-miR-191	27.0404	±	2.7322	25.3358	±	1.1665
bta-miR-192	31.4903	±	3.4781	29.6243	±	2.1642
bta-miR-193a	33.9917	±	0.0276	34.1981	±	2.0029
bta-miR-193a-3p	29.7623	±	3.4584	28.4370	±	0.7625
bta-miR-193a-5p	29.8589	±	2.0506	28.6848	±	0.2132
bta-miR-193b	30.9417	±	2.5314	29.9665	±	0.7224
bta-miR-194	31.1401	±	5.0746	29.5935	±	0.7638
bta-miR-195	28.3923	±	6.3899	24.6798	±	1.5476
bta-miR-196a	32.9341	±	0.4787	33.6542	±	1.1410
bta-miR-196b	34.7351	±	0.2566	34.0264	±	1.5549
bta-miR-197	27.7052	±	2.4423	24.7589	±	3.7423
bta-miR-199a-3p	30.6156	±	3.8429	28.2705	±	0.3039
bta-miR-199a-5p	30.2108	±	3.8438	28.4323	±	0.9698
bta-miR-199b	30.9959	±	3.7151	29.2309	±	1.3836
bta-miR-199c	29.5366	±	4.0545	27.9549	±	0.7967
bta-miR-19a	29.3688	±	5.1352	28.3138	±	0.1764
bta-miR-19b	29.0963	±	4.7204	28.0044	±	0.3447
bta-miR-200a				35.0432	±	1.7198
bta-miR-200b	31.9130	±	0.1111	32.4481	±	2.2682
bta-miR-200c	35.4964	±	2.1235	35.1603	±	0.1343
bta-miR-202	27.0764	±	7.4693	24.8412	±	1.5124
bta-miR-204	30.4144	±	4.1266	29.2192	±	1.0480
bta-miR-205	33.4446	±	1.8347	31.5896	±	0.8697
bta-miR-206	33.1580	±	1.4827	31.0775	±	1.0967
bta-miR-208a	35.5248	±	0.1390	34.6201	±	0.3135
bta-miR-208b	34.8810	±	0.5947	36.1281	±	0.0286
bta-miR-20a	26.7934	±	4.9253	25.3217	±	1.2840
bta-miR-20b	26.8756	±	4.3159	25.3773	±	0.5944
bta-miR-21-3p	31.4604	±	3.6998	29.2837	±	0.9498

bta-miR-21-5p	27.1453	±	4.8647	27.0092	±	1.7730
bta-miR-210	25.7531	±	2.3162	24.0361	±	0.6300
bta-miR-211	30.1107	±	3.4329	29.6843	±	0.8449
bta-miR-212	33.0805	±	0.0587	32.1187	±	1.0056
bta-miR-214	28.9334	±	2.9959	26.8182	±	0.5533
bta-miR-215	30.4866	±	0.2137	31.7999	±	0.1737
bta-miR-216a	32.7381	±	2.1281	31.0206	±	1.0406
bta-miR-216b	33.7188	±	1.1088	33.7250	±	0.2574
bta-miR-217	35.5852	±	0.4215	36.8733	±	0.0529
bta-miR-218				35.9556	±	1.3068
bta-miR-219	29.6924	±	3.0338	28.3914	±	1.1240
bta-miR-219-3p	31.5769	±	2.3320	29.9280	±	1.1565
bta-miR-219-5p				35.8302	±	0.0945
bta-miR-22-5p	30.4186	±	5.0156	29.0505	±	0.5804
bta-miR-221	26.4056	±	4.0330	25.3781	±	1.1115
bta-miR-222	25.9760	±	3.8954	25.6077	±	0.6423
bta-miR-223	34.4370	±	0.7090	32.6959	±	2.6667
bta-miR-224	29.6679	±	0.3709	28.8361	±	0.7468
bta-miR-23a	23.3410	±	0.0827	24.9032	±	0.2482
bta-miR-23b-3p	27.3797	±	3.7236	26.4853	±	0.6012
bta-miR-23b-5p	32.1625	±	2.8035	31.2177	±	0.6600
bta-miR-24	29.6187	±	0.1951	31.2640	±	0.6746
bta-miR-24-3p	26.6434	±	3.7555	25.8224	±	0.2353
bta-miR-25	26.9803	±	2.9862	25.0121	±	0.2995
bta-miR-26a	26.2575	±	4.1457	24.8798	±	0.6766
bta-miR-26b	26.0921	±	0.2851	26.9817	±	0.8404
bta-miR-27a-3p	26.0247	±	3.3085	26.6516	±	0.5593
bta-miR-27a-5p	29.7660	±	3.1721	22.5478	±	7.4810
bta-miR-27b	26.0752	±	3.2866	25.5489	±	0.1119
bta-miR-28	28.3155	±	3.9144	28.6703	±	0.6145
bta-miR-296-3p	28.9546	±	2.8252	26.9808	±	0.6202
bta-miR-296-5p	27.8790	±	2.6543	25.4760	±	0.9873
bta-miR-29a	25.5744	±	3.4242	24.3060	±	0.6515
bta-miR-29b	29.3807	±	3.4579	27.3726	±	1.2058
bta-miR-29c	25.7827	±	3.5256	24.5257	±	0.1795
bta-miR-29d-3p	31.4931	±	3.9586	28.9573	±	1.6852
bta-miR-29d-5p	32.5699	±	0.7426	32.0343	±	0.4611
bta-miR-29e	29.1701	±	0.8801	29.3605	±	0.4966
bta-miR-301a	31.7225	±	0.9725	33.0035	±	0.4780
bta-miR-301b	32.5990	±	1.9312	33.4179	±	1.3076
bta-miR-302c	33.8422	±	0.4392	33.7764	±	0.2893
bta-miR-30a-5p	27.0356	±	3.2380	25.3976	±	0.5872
bta-miR-30b-3p	31.9037	±	0.9701	31.4165	±	0.2645
bta-miR-30b-5p	27.5587	±	4.0854	26.3458	±	0.5480
bta-miR-30c	26.8343	±	4.4610	25.8917	±	1.6512
bta-miR-30d	26.9679	±	3.3602	25.1500	±	0.1637
bta-miR-30e-5p	26.9577	±	3.6147	25.3912	±	0.2185
bta-miR-30f	27.5221	±	3.9332	26.0512	±	1.3965
bta-miR-31	25.3025	±	3.3262	23.1544	±	0.5603
bta-miR-32	32.7310	±	0.6266	31.5617	±	0.1480
bta-miR-320a	25.2917	±	3.1258	24.2675	±	0.7328
bta-miR-320b	29.8153	±	3.7258	28.4886	±	0.6456
bta-miR-323	21.9626	±	1.1542	21.9567	±	0.9166
bta-miR-324	30.2121	±	3.0355	28.0264	±	0.4916
bta-miR-326	29.8589	±	3.7703	28.5318	±	0.7846
bta-miR-328	27.8427	±	1.6845	27.3779	±	0.4139
bta-miR-329a				36.0593	±	0.9672
bta-miR-329b				35.3206	±	0.9348
bta-miR-330	30.8982	±	2.5521	30.0187	±	1.4953
bta-miR-331-3p	27.5623	±	2.3603	26.6212	±	0.4859
bta-miR-331-5p	29.2310	±	0.3690	30.3971	±	2.2710

bta-miR-335	32.0424	±	1.2722	33.3360	±	2.7894
bta-miR-338	34.4942	±	0.3279	34.8252	±	1.8096
bta-miR-339a	29.4459	±	4.0598	26.4481	±	1.2841
bta-miR-339b	25.9045	±	3.2195	25.4242	±	0.7723
bta-miR-33a	31.1038	±	0.4205	31.7657	±	1.5616
bta-miR-33b	32.7447	±	1.6786	33.4004	±	1.9361
bta-miR-340	33.4317	±	2.0347	34.7813	±	1.4059
bta-miR-342	29.6295	±	3.9054	28.2253	±	1.4998
bta-miR-345-3p	31.7452	±	4.5041	31.2614	±	1.5847
bta-miR-345-5p	29.6592	±	3.0994	30.8788	±	1.8014
bta-miR-346	28.1492	±	5.0250	27.2294	±	1.9560
bta-miR-34a	28.2157	±	3.8741	29.4068	±	1.3636
bta-miR-34b	32.2762	±	0.4166	36.2198	±	1.0794
bta-miR-34c	32.6443	±	0.1388	33.3739	±	0.3532
bta-miR-361	31.1412	±	3.6482	30.9399	±	2.4093
bta-miR-362-3p	27.9182	±	0.7958	29.6525	±	1.5309
bta-miR-362-5p	31.7494	±	4.5308	31.0177	±	1.4470
bta-miR-363	34.0354	±	1.5325	33.4713	±	2.3676
bta-miR-365-3p	28.3263	±	3.7637	28.0524	±	1.6473
bta-miR-365-5p				30.4137	±	2.7003
bta-miR-367	35.4296	±	0.3158			
bta-miR-369-5p				31.2997	±	3.8788
bta-miR-370	28.1041	±	2.9141	28.9299	±	1.5488
bta-miR-371				34.5691	±	0.6277
bta-miR-374a	28.6341	±	0.3845	31.7056	±	2.2967
bta-miR-374b				28.4418	±	1.4966
bta-miR-375	29.3332	±	0.2898	30.8500	±	1.5124
bta-miR-376a	35.3784	±	0.0592	33.7679	±	0.4505
bta-miR-378	27.3435	±	2.3123	26.1072	±	2.0852
bta-miR-378b	27.3481	±	2.5301	28.1142	±	1.0815
bta-miR-378c	30.4584	±	2.3949	31.2733	±	1.7735
bta-miR-379	32.1396	±	0.6307	33.2714	±	1.1385
bta-miR-380-3p	33.8323	±	1.5436	33.7475	±	1.9206
bta-miR-380-5p	32.2550	±	0.0944	32.8388	±	3.5509
bta-miR-381	32.9308	±	1.3486	33.0047	±	2.5374
bta-miR-382	32.9940	±	2.0891	32.5358	±	1.2433
bta-miR-383	31.9965	±	3.0916	31.7413	±	2.2636
bta-miR-409a	33.9988	±	1.9469	34.3061	±	1.9052
bta-miR-409b	33.9988	±	1.2222	34.8842	±	1.8171
bta-miR-410	32.7024	±	1.6889	33.4712	±	2.9157
bta-miR-411a	34.7302	±	1.2513	33.9535	±	1.5250
bta-miR-411b	34.0606	±	1.9130	35.4911	±	2.2536
bta-miR-411c-3p	35.5693	±	0.0804	34.2954	±	0.3192
bta-miR-412	33.7757	±	0.8538	34.8839	±	1.6386
bta-miR-421	27.5290	±	3.1985	24.8862	±	3.7613
bta-miR-423-3p	27.3021	±	2.8773	26.5525	±	1.0452
bta-miR-423-5p	28.7021	±	2.7009	27.3833	±	1.1721
bta-miR-424-3p	32.3907	±	2.5658	32.6872	±	2.8100
bta-miR-424-5p	27.1739	±	0.4335	27.4674	±	1.8607
bta-miR-425-3p	25.5592	±	4.0860	23.6870	±	4.0352
bta-miR-425-5p	28.4136	±	3.3754	27.3114	±	1.4723
bta-miR-429	33.9577	±	1.3921	34.4175	±	1.9659
bta-miR-431	31.6897	±	3.9684	31.3900	±	1.0506
bta-miR-432	31.5099	±	0.1120	32.2004	±	2.0238
bta-miR-433	31.9568	±	4.2082	30.8778	±	1.7937
bta-miR-448	34.3042	±	0.2089	33.9062	±	3.6472
bta-miR-449a	33.1307	±	4.7201			
bta-miR-449b	30.4921	±	0.3588	31.4244	±	1.4635
bta-miR-449c	31.3263	±	0.1634	32.5272	±	1.9713
bta-miR-449d	28.3813	±	5.3149	27.3124	±	0.8239
bta-miR-450a	33.8621	±	1.2061	33.0280	±	0.6065

bta-miR-450b	34.5321	±	1.1431	33.9373	±	1.2289
bta-miR-451	28.4651	±	2.3032			
bta-miR-453	33.4788	±	3.6311	32.1218	±	1.2351
bta-miR-454	29.9740	±	0.3361	33.0932	±	1.7729
bta-miR-455-3p	29.7111	±	0.1719	32.3137	±	1.3241
bta-miR-455-5p	29.8364	±	0.4124	32.7164	±	1.9634
bta-miR-483	32.3781	±	3.2417	33.9611	±	2.1311
bta-miR-484	28.5631	±	2.5323	28.2283	±	1.3129
bta-miR-485	34.8198	±	1.4459	35.0214	±	0.8291
bta-miR-486	28.2567	±	3.8119	27.6891	±	1.7839
bta-miR-487a	32.4943	±	0.3878	34.1559	±	2.3267
bta-miR-487b	33.4890	±	0.0679	34.2846	±	2.3878
bta-miR-488	34.4192	±	1.1016	34.3229	±	2.2607
bta-miR-489	31.7956	±	0.4609	33.7613	±	2.1180
bta-miR-490	29.9856	±	0.4047	32.2394	±	1.1096
bta-miR-491	31.8104	±	2.4286	30.7341	±	0.8985
bta-miR-493	28.8703	±	5.4761	27.8871	±	1.0005
bta-miR-494	17.8235	±	7.0661	16.6409	±	1.3348
bta-miR-495				35.8941	±	0.3564
bta-miR-496	33.8488	±	0.2225	35.5883	±	1.6117
bta-miR-497	30.0262	±	4.5919	27.4390	±	1.2528
bta-miR-499	33.8155	±	0.2211	35.6537	±	0.4379
bta-miR-500	30.7897	±	4.5357	29.7192	±	2.1573
bta-miR-502a	31.9685	±	0.6319	32.8963	±	0.4445
bta-miR-502b	30.7123	±	4.1909	29.6968	±	2.1211
bta-miR-503-3p	28.9752	±	7.1520	27.1519	±	2.7139
bta-miR-503-5p	31.0162	±	1.3315	29.6613	±	1.3516
bta-miR-504	31.9929	±	2.9856	31.8059	±	1.6505
bta-miR-505	29.2401	±	2.9925	28.5258	±	3.7149
bta-miR-532	29.2520	±	2.4942	30.7405	±	2.5348
bta-miR-539	35.4321	±	0.5172			
bta-miR-541	30.0154	±	4.1357	30.0746	±	2.3470
bta-miR-542-5p	32.9126	±	0.8651	33.0461	±	2.2105
bta-miR-543	34.6928	±	1.5649			
bta-miR-544a	34.1898	±	0.1821	34.2724	±	1.4861
bta-miR-544b				32.1819	±	1.2773
bta-miR-545-3p	31.5609	±	1.7890	32.1013	±	0.8248
bta-miR-545-5p	31.7773	±	1.9903	33.6659	±	2.2224
bta-miR-551a	33.2375	±	0.4185	32.9765	±	1.7111
bta-miR-551b	32.7706	±	1.6508	35.2758	±	0.8736
bta-miR-562				33.6486	±	0.1997
bta-miR-574	24.5426	±	4.4262	23.9335	±	2.6355
bta-miR-584	27.9303	±	0.1840	30.9454	±	2.0969
bta-miR-592	32.7011	±	0.5917	33.6504	±	2.7783
bta-miR-615	20.3448	±	13.2443	13.8331	±	1.2883
bta-miR-628	33.3101	±	0.4133	34.9417	±	1.1690
bta-miR-631	23.1902	±	0.7494	23.5504	±	3.6682
bta-miR-652	27.7813	±	2.7577	28.2139	±	3.2201
bta-miR-653	35.3272	±	2.0769			
bta-miR-654	29.4895	±	2.5828	30.7576	±	1.0139
bta-miR-656	34.6369	±	0.5933	32.6436	±	2.2411
bta-miR-658	30.2859	±	3.2608	30.1477	±	2.0946
bta-miR-660	30.3964	±	4.7522	30.4029	±	2.2143
bta-miR-664	27.2069	±	4.1896	27.0125	±	2.8156
bta-miR-664b	27.2533	±	3.6403	26.0164	±	0.7774
bta-miR-665	25.8177	±	3.3277	25.2120	±	2.6481
bta-miR-669	27.0672	±	4.3948	26.6684	±	1.9433
bta-miR-670	33.3410	±	0.3583	33.4903	±	1.2873
bta-miR-671	31.9060	±	3.5171	31.8227	±	2.9401
bta-miR-677	24.6345	±	3.4991	24.5409	±	2.1307
bta-miR-7	29.1695	±	1.1169	30.7753	±	1.4574

bta-miR-708	27.7507	±	3.3996	28.8186	±	3.2347
bta-miR-744	30.5602	±	2.6526	30.9803	±	3.6759
bta-miR-758	34.5505	±	0.1184	33.6740	±	2.1555
bta-miR-759	35.1810	±	1.0334			
bta-miR-760-3p	28.4295	±	3.0166	29.4019	±	2.7686
bta-miR-760-5p	27.1480	±	4.1558	26.5242	±	2.0523
bta-miR-761	32.0272	±	0.0084	32.3364	±	2.5525
bta-miR-763	30.0582	±	4.6595	29.7709	±	2.1813
bta-miR-764	32.3918	±	2.0719	32.4911	±	1.8367
bta-miR-767	31.5592	±	3.5763	31.4843	±	2.7732
bta-miR-769	31.6924	±	1.8569	31.7366	±	0.0001
bta-miR-873	30.7416	±	0.3106	31.6909	±	1.9058
bta-miR-874	28.4690	±	3.6259	27.8906	±	2.0225
bta-miR-875	36.6021	±	0.4765			
bta-miR-876	31.6731	±	0.8891	32.3103	±	3.7738
bta-miR-877	27.4654	±	3.6529	26.9539	±	2.4553
bta-miR-885	29.0542	±	0.0837	30.2374	±	1.3154
bta-miR-9-5p	31.9792	±	0.2986	33.3000	±	0.3243
bta-miR-92a	26.2684	±	3.0981	24.1335	±	0.6646
bta-miR-92b	26.4647	±	4.4524	24.5611	±	4.1092
bta-miR-93	27.8023	±	5.1243	26.5933	±	2.4207
bta-miR-935	27.3492	±	0.4989	27.6214	±	2.4832
bta-miR-940	23.3998	±	4.2959	21.9443	±	2.6009
bta-miR-95	30.2885	±	5.5512	33.5795	±	0.8496
bta-miR-96	30.2780	±	4.0497	31.6047	±	2.8327
bta-miR-98	28.0738	±	0.9839	31.5309	±	3.0847
bta-miR-99a-3p	29.3912	±	0.7316	30.7224	±	2.7713
bta-miR-99a-5p	27.3662	±	5.0463	26.3908	±	2.8960

APÊNDICE F – Lista completa dos miRNAs identificados nas vesículas extracelulares recuperadas do meio de cultivo de células da granulosa (CG-VE) e de complexos cumulus-oócito (COC-VE) em bovinos, com os valores médios de Ct e desvios padrão.

miRNAs	CG-VE			COC-VE		
	Ct		SD	Ct		SD
bta-let-7e				32.8349	±	1.8560
bta-let-7f				34.4452	±	1.9147
bta-let-7i				34.6139	±	2.3392
bta-miR-1				35.6126	±	0.5210
bta-miR-100				34.2690	±	1.7321
bta-miR-101				35.2985	±	0.6334
bta-miR-106a				34.4127	±	2.0994
bta-miR-122	35.0550	±	0.0576	32.1091	±	1.5674
bta-miR-124b				34.8374	±	1.3826
bta-miR-125a				34.1775	±	1.8819
bta-miR-125b	34.8363	±	2.5186			
bta-miR-127	35.5055	±	1.1355	34.0873	±	0.9642
bta-miR-129				34.6555	±	1.9062
bta-miR-130a	35.7865	±	0.5982	34.4048	±	1.2759
bta-miR-130b	34.9203	±	1.0126			
bta-miR-132	36.4531	±	0.2840			
bta-miR-133a				32.7811	±	2.0572
bta-miR-143	34.9526	±	0.1319			
bta-miR-145				33.2904	±	2.4189
bta-miR-149-3p				30.6392	±	4.3902
bta-miR-149-5p				33.1371	±	4.7311
bta-miR-154b	34.0835	±	0.5031			
bta-miR-155	35.0577	±	0.1361			
bta-miR-15a				33.6050	±	1.1378
bta-miR-16a	35.1562	±	0.3992	33.4957	±	1.8260
bta-miR-16b				33.0964	±	2.1405
bta-miR-187				34.2578	±	1.3854
bta-miR-197	34.2599	±	2.5054			
bta-miR-210				33.8631	±	2.6586
bta-miR-25				35.0709	±	1.6143
bta-miR-26a				33.8057	±	1.0028
bta-miR-27a-5p	27.2737	±	7.7794			
bta-miR-29d-5p	34.3579	±	0.9432			
bta-miR-30c				36.5003	±	0.5010
bta-miR-320a	35.6338	±	1.5395	33.6132	±	2.4428
bta-miR-323	23.3589	±	0.1922	23.9557	±	1.5151
bta-miR-328	32.7706	±	2.1887	33.3054	±	2.2127
bta-miR-339b				35.1206	±	0.2390
bta-miR-346				33.5442	±	1.9187
bta-miR-370	35.6631	±	1.8357			
bta-miR-378b				34.9816	±	0.5990
bta-miR-382	33.2055	±	0.8847	32.8049	±	1.5904
bta-miR-421	35.4174	±	1.2205	31.2360	±	5.1971
bta-miR-425-3p				29.4636	±	4.6036
bta-miR-429	34.6892	±	0.4716	34.8139	±	0.8888
bta-miR-433	34.9241	±	1.9521	34.9319	±	0.6108
bta-miR-449c	35.3116	±	0.9157	35.2744	±	1.0060
bta-miR-453				34.9461	±	0.9804
bta-miR-494	32.5444	±	3.2927	26.2805	±	3.0720
bta-miR-502b	36.1368	±	1.3030			
bta-miR-503-3p	33.9991	±	3.2993	33.6885	±	0.5601
bta-miR-532	34.7867	±	1.3662	34.1639	±	2.0712
bta-miR-541	34.3168	±	2.2261	33.9933	±	0.4393

bta-miR-574	30.8967	± 5.5039	29.1830	± 2.6386
bta-miR-615	14.6283	± 2.7216	20.9526	± 13.5038
bta-miR-631	22.9490	± 0.6543	23.0445	± 0.5410
bta-miR-656	34.8564	± 0.0897	34.8677	± 1.0794
bta-miR-665			31.1990	± 2.7102
bta-miR-760-3p	33.4013	± 0.9600		
bta-miR-760-5p	34.0028	± 2.7860	33.3872	± 0.8547
bta-miR-767	35.2541	± 2.1337	35.7282	± 0.9774
bta-miR-874			33.8652	± 0.8225
bta-miR-877			32.8768	± 1.0911
bta-miR-885	34.9749	± 1.4225		
bta-miR-92b	30.5707	± 6.3493	30.0625	± 2.6220
bta-miR-935	32.4771	± 4.7654	34.2383	± 1.9021

APÊNDICE G – Lista dos miRNAs identificados nas vesículas extracelulares do líquido folicular. Os valores de Ct representam a media das amostras. DV = desvio padrão

miRNAs	Valor de Ct	DV	miRNAs	Valor de Ct	DV
bta-let-7a-5p	19.734	±	16.400	bta-miR-320a	24.990 ± 10.953
bta-let-7b	17.844	±	14.807	bta-miR-320b	19.715 ± 16.542
bta-let-7c	23.177	±	14.477	bta-miR-323	22.006 ± 0.386
bta-let-7d	16.784	±	17.955	bta-miR-326	14.672 ± 15.851
bta-let-7e	19.474	±	16.146	bta-miR-328	26.128 ± 10.938
bta-let-7g	20.099	±	16.689	bta-miR-329a	21.884 ± 18.157
bta-let-7i	16.125	±	17.263	bta-miR-330	15.514 ± 16.708
bta-miR-100	20.157	±	16.811	bta-miR-331-5p	28.675 ± 12.064
bta-miR-103	16.918	±	18.138	bta-miR-339a	18.782 ± 15.833
bta-miR-106a	18.827	±	15.724	bta-miR-339b	30.553 ± 3.079
bta-miR-106b	19.912	±	16.662	bta-miR-345-3p	15.677 ± 16.981
bta-miR-10b	17.076	±	18.285	bta-miR-345-5p	28.268 ± 11.759
bta-miR-124b	16.462	±	17.698	bta-miR-346	18.758 ± 15.937
bta-miR-125a	16.058	±	17.214	bta-miR-34a	28.459 ± 11.815
bta-miR-125b	18.534	±	15.443	bta-miR-361	15.997 ± 17.277
bta-miR-126-3p	20.342	±	16.868	bta-miR-362-3p	16.589 ± 17.783
bta-miR-126-5p	24.611	±	15.210	bta-miR-363	21.023 ± 17.531
bta-miR-127	25.258	±	15.851	bta-miR-365-3p	20.495 ± 17.023
bta-miR-128	16.855	±	18.099	bta-miR-365-5p	14.676 ± 15.994
bta-miR-129	15.379	±	16.552	bta-miR-370	24.202 ± 15.275
bta-miR-129-5p	16.052	±	17.389	bta-miR-374b	21.159 ± 17.560
bta-miR-130a	24.865	±	15.578	bta-miR-375	21.110 ± 17.626
bta-miR-130b	29.275	±	12.072	bta-miR-378	15.339 ± 16.678
bta-miR-132	15.984	±	17.142	bta-miR-378c	21.422 ± 17.938
bta-miR-133a	16.440	±	17.745	bta-miR-380-3p	16.792 ± 18.118
bta-miR-134	16.347	±	17.626	bta-miR-380-5p	30.806 ± 2.318
bta-miR-138	27.742	±	11.606	bta-miR-381	16.210 ± 17.521
bta-miR-139	16.677	±	17.987	bta-miR-382	29.197 ± 3.234
bta-miR-140	16.313	±	17.590	bta-miR-383	28.591 ± 11.821
bta-miR-143	31.694	±	1.539	bta-miR-421	30.565 ± 5.630
bta-miR-145	18.893	±	15.965	bta-miR-423-3p	19.334 ± 16.266
bta-miR-148a	15.265	±	16.343	bta-miR-423-5p	17.943 ± 15.091
bta-miR-148b	15.676	±	16.784	bta-miR-424-3p	15.941 ± 17.189
bta-miR-149-3p	22.372	±	14.370	bta-miR-424-5p	17.855 ± 15.083
bta-miR-149-5p	15.743	±	17.037	bta-miR-425-3p	27.278 ± 11.656
bta-miR-151-3p	19.744	±	16.543	bta-miR-425-5p	20.995 ± 17.599
bta-miR-151-5p	15.955	±	17.163	bta-miR-429	31.609 ± 3.314
bta-miR-152	16.563	±	17.848	bta-miR-432	28.945 ± 12.109
bta-miR-154b	32.917	±	1.358	bta-miR-433	29.344 ± 12.323
bta-miR-155	17.082	±	18.281	bta-miR-449a	21.168 ± 17.582
bta-miR-15a	15.534	±	16.628	bta-miR-449c	24.877 ± 15.573
bta-miR-15b	15.856	±	17.063	bta-miR-449d	19.303 ± 16.320
bta-miR-16a	19.414	±	16.274	bta-miR-453	20.512 ± 17.067
bta-miR-16b	18.657	±	15.583	bta-miR-483	20.746 ± 17.392
bta-miR-17-5p	16.493	±	17.700	bta-miR-484	28.878 ± 12.066
bta-miR-181b	20.712	±	17.267	bta-miR-485	17.289 ± 18.574
bta-miR-181c	17.509	±	18.739	bta-miR-486	18.803 ± 15.818
bta-miR-181d	20.695	±	17.226	bta-miR-490	15.761 ± 17.086
bta-miR-185	17.380	±	18.615	bta-miR-491	16.506 ± 17.772
bta-miR-186	19.777	±	16.615	bta-miR-493	18.970 ± 16.073
bta-miR-187	15.574	±	16.864	bta-miR-494	29.862 ± 3.920
bta-miR-188	15.808	±	17.059	bta-miR-495	17.566 ± 18.882
bta-miR-18a	16.310	±	17.457	bta-miR-497	15.489 ± 16.654
bta-miR-191	30.722	±	2.950	bta-miR-500	16.542 ± 17.771
bta-miR-193a-3p	21.171	±	17.683	bta-miR-502b	33.242 ± 2.611
bta-miR-193a-5p	19.571	±	16.408	bta-miR-503-3p	25.367 ± 11.962

bta-miR-193b	16.667	±	17.957	bta-miR-503-5p	16.323	±	17.538
bta-miR-195	23.834	±	14.991	bta-miR-504	16.696	±	18.089
bta-miR-196a	16.486	±	17.709	bta-miR-505	24.459	±	15.387
bta-miR-196b	17.007	±	18.278	bta-miR-532	27.793	±	11.437
bta-miR-197	19.353	±	16.271	bta-miR-541	32.452	±	3.425
bta-miR-199a-3p	24.080	±	15.153	bta-miR-542-5p	16.756	±	18.005
bta-miR-199a-5p	16.357	±	17.504	bta-miR-551b	16.996	±	18.261
bta-miR-199c	18.966	±	15.872	bta-miR-574	27.427	±	5.298
bta-miR-19a	20.340	±	17.035	bta-miR-584	23.634	±	14.943
bta-miR-19b	20.393	±	17.051	bta-miR-592	21.617	±	17.947
bta-miR-202	15.185	±	16.291	bta-miR-615	7.729	±	6.467
bta-miR-204	17.626	±	18.921	bta-miR-631	22.981	±	0.992
bta-miR-20a	18.957	±	15.894	bta-miR-652	24.175	±	15.134
bta-miR-20b	18.966	±	15.865	bta-miR-656	33.997	±	2.133
bta-miR-21-3p	16.549	±	17.857	bta-miR-658	20.560	±	17.149
bta-miR-210	15.206	±	16.395	bta-miR-660	28.955	±	11.891
bta-miR-211	16.891	±	18.168	bta-miR-664	15.015	±	16.336
bta-miR-214	19.089	±	16.109	bta-miR-664b	25.190	±	15.746
bta-miR-219	29.862	±	12.432	bta-miR-665	14.622	±	15.732
bta-miR-219-3p	16.422	±	17.722	bta-miR-669	21.271	±	13.943
bta-miR-221	20.082	±	16.786	bta-miR-677	16.634	±	17.968
bta-miR-224	17.225	±	18.440	bta-miR-708	20.489	±	17.150
bta-miR-23a	23.372	±	14.760	bta-miR-744	15.592	±	16.745
bta-miR-23b-3p	15.974	±	17.118	bta-miR-760-3p	27.736	±	11.720
bta-miR-24-3p	13.907	±	14.978	bta-miR-760-5p	29.814	±	2.763
bta-miR-25	22.481	±	14.181	bta-miR-763	15.628	±	16.940
bta-miR-26a	15.152	±	16.223	bta-miR-764	16.579	±	17.887
bta-miR-26b	16.570	±	17.723	bta-miR-767	28.733	±	11.920
bta-miR-27a-3p	23.490	±	14.634	bta-miR-769	29.753	±	12.457
bta-miR-27b	23.629	±	14.884	bta-miR-874	19.692	±	16.600
bta-miR-296-3p	18.456	±	15.420	bta-miR-877	22.652	±	14.388
bta-miR-296-5p	15.313	±	16.480	bta-miR-885	20.429	±	17.214
bta-miR-29a	14.349	±	15.380	bta-miR-9-5p	21.354	±	17.792
bta-miR-29c	18.655	±	15.587	bta-miR-92a	30.053	±	4.525
bta-miR-29d-3p	16.485	±	17.673	bta-miR-92b	30.162	±	3.946
bta-miR-29d-5p	16.244	±	17.451	bta-miR-93	18.724	±	15.612
bta-miR-30a-5p	23.965	±	15.025	bta-miR-935	25.045	±	15.747
bta-miR-30b-5p	21.177	±	17.649	bta-miR-940	25.567	±	10.933
bta-miR-30c	16.616	±	17.869	bta-miR-95	16.691	±	17.922
bta-miR-30d	19.610	±	16.420	bta-miR-99a-3p	24.658	±	15.328
bta-miR-30e-5p	24.168	±	15.144	bta-miR-99a-5p	19.240	±	15.981
bta-miR-30f	20.159	±	16.807	bta-miR-99b	24.776	±	2.172
bta-miR-31	19.377	±	16.170				

APÊNDICE H – Lista completa comparando os miRNAs identificados nos diferentes compartimentos do ambiente folicular. Células da granulosa = GCs, complexo umulus-oócito = COCs, vesículas extracelulares das células da granulosa = GC-VEs, vesículas extracelulares dos complexos cumulus-oócito = COC-VEs e nas vesículas extracelulares do fluido folicular = FF-VEs

microRNAs	FF-EVs	GC-Cell	GC-EVs	COC-Cell	COC-EVs
bta-let-7a-3p		P		P	
bta-let-7a-5p	P	P		P	
bta-let-7b	P	P		P	
bta-let-7c	P	P		P	
bta-let-7d	P	P		P	
bta-let-7e	P	P		P	P
bta-let-7f		P		P	P
bta-let-7g	P	P		P	
bta-let-7i	P	P		P	P
bta-miR-1					P
bta-miR-100	P	P		P	P
bta-miR-101		P		P	P
bta-miR-103	P	P		P	
bta-miR-105a				P	
bta-miR-105b		P		P	
bta-miR-106a	P	P		P	P
bta-miR-106b	P	P		P	
bta-miR-107		P		P	
bta-miR-10a		P		P	
bta-miR-10b	P	P		P	
bta-miR-122		P	P	P	P
bta-miR-124a		P		P	
bta-miR-124b	P	P		P	P
bta-miR-125a	P	P		P	P
bta-miR-125b	P	P	P	P	
bta-miR-126-3p	P			P	
bta-miR-126-5p	P	P		P	
bta-miR-127	P	P	P	P	P
bta-miR-128	P	P		P	
bta-miR-129	P	P		P	P
bta-miR-129-3p		P		P	
bta-miR-129-5p	P	P		P	
bta-miR-130a	P	P	P	P	P
bta-miR-130b	P	P	P	P	
bta-miR-132	P	P	P	P	
bta-miR-133a	P	P		P	P
bta-miR-133b		P		P	
bta-miR-133c		P		P	
bta-miR-134	P	P		P	
bta-miR-135a		P		P	
bta-miR-135b		P		P	
bta-miR-136		P		P	
bta-miR-137				P	
bta-miR-138	P	P		P	
bta-miR-139	P	P		P	
bta-miR-140	P	P		P	
bta-miR-141		P		P	
bta-miR-142-3p				P	
bta-miR-142-5p		P		P	
bta-miR-143	P	P	P	P	
bta-miR-145	P	P		P	P
bta-miR-146a		P		P	
bta-miR-146b		P		P	
bta-miR-147		P		P	

bta-miR-148a	P	P		P	
bta-miR-148b	P	P		P	
bta-miR-149-3p	P	P		P	P
bta-miR-149-5p	P	P		P	P
bta-miR-150		P		P	
bta-miR-151-3p	P	P		P	
bta-miR-151-5p	P	P		P	
bta-miR-152	P	P		P	
bta-miR-153		P		P	
bta-miR-154a		P		P	
bta-miR-154b	P	P	P	P	
bta-miR-154c		P		P	
bta-miR-155	P	P	P	P	
bta-miR-15a	P	P		P	P
bta-miR-15b	P	P		P	
bta-miR-16a	P	P	P	P	P
bta-miR-16b	P	P		P	P
bta-miR-17-3p		P		P	
bta-miR-17-5p	P	P		P	
bta-miR-181a		P		P	
bta-miR-181b	P	P		P	
bta-miR-181c	P	P		P	
bta-miR-181d	P	P		P	
bta-miR-182		P		P	
bta-miR-183		P		P	
bta-miR-185	P	P		P	
bta-miR-186	P	P		P	
bta-miR-187	P	P		P	P
bta-miR-188	P	P		P	
bta-miR-18a	P	P		P	
bta-miR-18b		P		P	
bta-miR-190a		P		P	
bta-miR-190b		P		P	
bta-miR-191	P	P		P	
bta-miR-192		P		P	
bta-miR-193a		P		P	
bta-miR-193a-3p	P	P		P	
bta-miR-193a-5p	P	P		P	
bta-miR-193b	P	P		P	
bta-miR-194		P		P	
bta-miR-195	P	P		P	
bta-miR-196a	P	P		P	
bta-miR-196b	P	P		P	
bta-miR-197	P	P	P	P	
bta-miR-199a-3p	P	P		P	
bta-miR-199a-5p	P	P		P	
bta-miR-199b		P		P	
bta-miR-199c	P	P		P	
bta-miR-19a	P	P		P	
bta-miR-19b	P	P		P	
bta-miR-200a				P	
bta-miR-200b		P		P	
bta-miR-200c		P		P	
bta-miR-202	P	P		P	
bta-miR-204	P	P		P	
bta-miR-205		P		P	
bta-miR-206		P		P	
bta-miR-208a		P		P	
bta-miR-208b		P		P	
bta-miR-20a	P	P		P	
bta-miR-20b	P	P		P	

bta-miR-21-3p	P	P		P	
bta-miR-21-5p		P		P	
bta-miR-210	P	P		P	P
bta-miR-211	P	P		P	
bta-miR-212		P		P	
bta-miR-214	P	P		P	
bta-miR-215		P		P	
bta-miR-216a		P		P	
bta-miR-216b		P		P	
bta-miR-217		P		P	
bta-miR-218				P	
bta-miR-219	P	P		P	
bta-miR-219-3p	P	P		P	
bta-miR-219-5p				P	
bta-miR-22-5p		P		P	
bta-miR-221	P	P		P	
bta-miR-222		P		P	
bta-miR-223		P		P	
bta-miR-224	P	P		P	
bta-miR-23a	P	P		P	
bta-miR-23b-3p	P	P		P	
bta-miR-23b-5p		P		P	
bta-miR-24		P		P	
bta-miR-24-3p	P	P		P	
bta-miR-25	P	P		P	P
bta-miR-26a	P	P		P	P
bta-miR-26b	P	P		P	
bta-miR-27a-3p	P	P		P	
bta-miR-27a-5p		P	P	P	
bta-miR-27b	P	P		P	
bta-miR-28		P		P	
bta-miR-296-3p	P	P		P	
bta-miR-296-5p	P	P		P	
bta-miR-29a	P	P		P	
bta-miR-29b		P		P	
bta-miR-29c	P	P		P	
bta-miR-29d-3p	P	P		P	
bta-miR-29d-5p	P	P	P	P	
bta-miR-29e		P		P	
bta-miR-301a		P		P	
bta-miR-301b		P		P	
bta-miR-302c		P		P	
bta-miR-30a-5p	P	P		P	
bta-miR-30b-3p		P		P	
bta-miR-30b-5p	P	P		P	
bta-miR-30c	P	P		P	P
bta-miR-30d	P	P		P	
bta-miR-30e-5p	P	P		P	
bta-miR-30f	P	P		P	
bta-miR-31	P	P		P	
bta-miR-32		P		P	
bta-miR-320a	P	P	P	P	P
bta-miR-320b	P	P		P	
bta-miR-323	P	P	P	P	P
bta-miR-324		P		P	
bta-miR-326	P	P		P	
bta-miR-328	P	P	P	P	P
bta-miR-329a	P			P	
bta-miR-329b				P	
bta-miR-330	P	P		P	
bta-miR-331-3p		P		P	

bta-miR-331-5p	P	P	P	
bta-miR-335		P	P	
bta-miR-338		P	P	
bta-miR-339a	P	P	P	
bta-miR-339b	P	P	P	P
bta-miR-33a		P	P	
bta-miR-33b		P	P	
bta-miR-340		P	P	
bta-miR-342		P	P	
bta-miR-345-3p	P	P	P	
bta-miR-345-5p	P	P	P	
bta-miR-346	P	P	P	P
bta-miR-34a	P	P	P	
bta-miR-34b		P	P	
bta-miR-34c		P	P	
bta-miR-361	P	P	P	
bta-miR-362-3p	P	P	P	
bta-miR-362-5p		P	P	
bta-miR-363	P	P	P	
bta-miR-365-3p	P	P	P	
bta-miR-365-5p	P		P	
bta-miR-367		P		
bta-miR-369-5p			P	
bta-miR-370	P	P	P	
bta-miR-371			P	
bta-miR-374a		P	P	
bta-miR-374b	P		P	
bta-miR-375	P	P	P	
bta-miR-376a		P	P	
bta-miR-378	P	P	P	
bta-miR-378b		P	P	P
bta-miR-378c	P	P	P	
bta-miR-379		P	P	
bta-miR-380-3p	P	P	P	
bta-miR-380-5p	P	P	P	
bta-miR-381	P	P	P	
bta-miR-382	P	P	P	P
bta-miR-383	P	P	P	
bta-miR-409a		P	P	
bta-miR-409b		P	P	
bta-miR-410		P	P	
bta-miR-411a		P	P	
bta-miR-411b		P	P	
bta-miR-411c-3p		P	P	
bta-miR-412		P	P	
bta-miR-421	P	P	P	P
bta-miR-423-3p	P	P	P	
bta-miR-423-5p	P	P	P	
bta-miR-424-3p	P	P	P	
bta-miR-424-5p	P	P	P	
bta-miR-425-3p	P	P	P	P
bta-miR-425-5p	P	P	P	
bta-miR-429	P	P	P	P
bta-miR-431		P	P	
bta-miR-432	P	P	P	
bta-miR-433	P	P	P	P
bta-miR-448		P	P	
bta-miR-449a	P	P		
bta-miR-449b		P	P	
bta-miR-449c	P	P	P	P
bta-miR-449d	P	P	P	

bta-miR-450a		P		P	
bta-miR-450b		P		P	
bta-miR-451		P			
bta-miR-453	P	P		P	P
bta-miR-454		P		P	
bta-miR-455-3p		P		P	
bta-miR-455-5p		P		P	
bta-miR-483	P	P		P	
bta-miR-484	P	P		P	
bta-miR-485	P	P		P	
bta-miR-486	P	P		P	
bta-miR-487a		P		P	
bta-miR-487b		P		P	
bta-miR-488		P		P	
bta-miR-489		P		P	
bta-miR-490	P	P		P	
bta-miR-491	P	P		P	
bta-miR-493	P	P		P	
bta-miR-494	P	P	P	P	P
bta-miR-495	P			P	
bta-miR-496		P		P	
bta-miR-497	P	P		P	
bta-miR-499		P		P	
bta-miR-500	P	P		P	
bta-miR-502a		P		P	
bta-miR-502b	P	P	P	P	
bta-miR-503-3p	P	P	P	P	P
bta-miR-503-5p	P	P		P	
bta-miR-504	P	P		P	
bta-miR-505	P	P		P	
bta-miR-532	P	P	P	P	P
bta-miR-539		P			
bta-miR-541	P	P	P	P	P
bta-miR-542-5p	P	P		P	
bta-miR-543		P			
bta-miR-544a		P		P	
bta-miR-544b				P	
bta-miR-545-3p		P		P	
bta-miR-545-5p		P		P	
bta-miR-551a		P		P	
bta-miR-551b	P	P		P	
bta-miR-562				P	
bta-miR-574	P	P	P	P	P
bta-miR-584	P	P		P	
bta-miR-592	P	P		P	
bta-miR-615	P	P	P	P	P
bta-miR-628		P		P	
bta-miR-631	P	P	P	P	P
bta-miR-652	P	P		P	
bta-miR-653		P			
bta-miR-654		P		P	
bta-miR-656	P	P	P	P	P
bta-miR-658	P	P		P	
bta-miR-660	P	P		P	
bta-miR-664	P	P		P	
bta-miR-664b	P	P		P	
bta-miR-665	P	P		P	P
bta-miR-669	P	P		P	
bta-miR-670		P		P	
bta-miR-671		P		P	
bta-miR-677	P	P		P	

bta-miR-7		P		P	
bta-miR-708	P	P		P	
bta-miR-744	P	P		P	
bta-miR-758		P		P	
bta-miR-759		P			
bta-miR-760-3p	P	P	P	P	
bta-miR-760-5p	P	P	P	P	P
bta-miR-761		P		P	
bta-miR-763	P	P		P	
bta-miR-764	P	P		P	
bta-miR-767	P	P	P	P	P
bta-miR-769	P	P		P	
bta-miR-873		P		P	
bta-miR-874	P	P		P	P
bta-miR-875		P			
bta-miR-876		P		P	
bta-miR-877	P	P		P	P
bta-miR-885	P	P	P	P	
bta-miR-9-5p	P	P		P	
bta-miR-92a	P	P		P	
bta-miR-92b	P	P	P	P	P
bta-miR-93	P	P		P	
bta-miR-935	P	P	P	P	P
bta-miR-940	P	P		P	P
bta-miR-95	P	P		P	
bta-miR-96		P		P	
bta-miR-98		P		P	
bta-miR-99a-3p	P	P		P	
bta-miR-99a-5p	P	P		P	

APÊNDICE I – Lista dos genes diferentemente expressos no sequenciamento de RNAs nas comparações entre os grupos NC vs BL e NC vs CNB.

NC x BL						CNB x BL		
Genes	diferença	pvalue	Genes	diferença	pvalue	Genes	diferença	pvalue
ABHD17A	-0.204	6.1E-03	POP7	-0.282	1.0E-03	ALDOC	-0.285	4.5E-04
ABLM13	-0.379	3.0E-03	PPDPF	-0.237	1.4E-04	EIF5A	-0.211	1.0E-03
ACAD9	-0.300	4.9E-03	PPM1G	-0.191	1.0E-03	FOXL2	-0.356	8.1E-04
ACADS	-0.202	6.1E-03	PPP1R7	-0.263	5.1E-03	FOXP4	-0.237	1.2E-03
ADSL	-0.206	1.2E-03	PPP2R1A	-0.195	4.4E-03	IGFBP7	-0.291	1.6E-04
AHCY	-0.233	6.8E-04	PRKCSBP	-0.375	1.1E-03	IL10RB	-0.256	6.2E-04
ALDH16A1	-0.274	7.4E-05	PRKCSH	-0.201	3.2E-04	JUND	-0.289	8.7E-04
ALDOA	-0.233	3.7E-04	PRR14	-0.247	2.9E-03	PCBP2	-0.169	1.3E-05
ALDOC	-0.249	2.2E-03	PRR3	-0.244	2.0E-03	PTGR1	-0.382	1.0E-03
AMPD2	-0.211	4.1E-03	PRRC2A	-0.144	3.2E-03	RNPEP	-0.301	7.5E-04
APOA1	-0.192	3.8E-03	RABAC1	-0.184	3.7E-03	RPL11	-0.134	1.2E-03
APRT	-0.204	3.9E-03	RAD23A	-0.263	2.4E-04	RPL13	-0.152	9.4E-04
ARFIP2	-0.205	3.7E-03	RAD52	-0.323	1.0E-03	RPL23A	-0.205	5.8E-04
ARSG	-0.342	3.9E-03	RALY	-0.195	6.4E-04	RPL24	-0.136	7.9E-04
ATG4B	-0.262	1.5E-03	RARRES2	-0.204	1.5E-04	RPL36	-0.211	8.7E-06
ATP5B	-0.128	2.6E-03	RCN3	-0.220	1.4E-03	RPLP1	-0.148	3.4E-04
ATP5D	-0.241	4.1E-04	REPIN1	-0.325	1.4E-06	RPLP2	-0.155	8.0E-05
ATP5G2	-0.157	1.9E-03	RGP1	-0.219	2.2E-03	RPS13	-0.165	4.6E-04
ATXN2L	-0.203	4.3E-03	RIC8A	-0.234	4.0E-03	RPS15	-0.143	1.3E-03
AURKB	-0.304	5.8E-03	RNF10	-0.171	2.1E-04	RPS16	-0.144	8.8E-04
BCAR1	-0.287	2.7E-03	RNF126	-0.239	2.1E-03	RPS25	-0.126	5.0E-04
BCKDK	-0.267	9.8E-04	RNF187	-0.347	8.4E-05	RPS28	-0.158	4.7E-04
C18H19orf48	-0.239	1.3E-03	RNPEP	-0.261	3.5E-03	S100A13	-0.314	1.2E-03
C1H21orf33	-0.232	1.1E-03	RPL10	-0.245	3.3E-06	SNRNP70	-0.224	4.0E-04
C1QBP	-0.244	1.1E-05	RPL10A	-0.149	4.7E-03	STOML2	-0.200	7.2E-04
C29H11orf68	-0.246	4.2E-03	RPL11	-0.149	3.2E-04	TADA3	-0.219	2.7E-04
C7H19orf53	-0.226	3.7E-04	RPL13	-0.189	4.0E-05	TECR	-0.268	1.9E-04
CASP2	-0.247	5.6E-03	RPL13A	-0.167	5.1E-04	TRAPPC1	-0.256	1.1E-03
CBR3	-0.336	3.5E-03	RPL18	-0.188	5.5E-04	TRIM28	-0.174	9.2E-04
CDC25B	-0.407	1.0E-03	RPL18A	-0.225	9.6E-05	TRMU	-0.226	6.2E-04
CDCA3	-0.403	1.5E-03	RPL19	-0.148	7.8E-04	VIM	-0.272	7.0E-05
CDK5RAP2	-0.301	2.7E-03	RPL23	-0.160	6.9E-04			
CHCHD10	-0.347	5.7E-03	RPL23A	-0.205	5.7E-04			
CHFR	-0.233	3.9E-03	RPL27A	-0.195	1.2E-03			
CHKB	-0.229	4.8E-03	RPL28	-0.237	3.3E-05			
CLEC14A	-0.346	6.6E-03	RPL29	-0.170	3.1E-04			
CLU	-0.252	3.1E-03	RPL3	-0.218	5.9E-05			
CNPY3	-0.205	3.7E-03	RPL31	-0.146	4.5E-03			
COG1	-0.278	9.7E-05	RPL32	-0.195	1.9E-05			
COPE	-0.189	1.1E-03	RPL34	-0.130	6.5E-03			
COPG1	-0.216	3.1E-04	RPL35A	-0.154	1.1E-03			
COX5A	-0.208	1.6E-03	RPL36	-0.233	9.7E-07			
CSNK2B	-0.186	4.5E-03	RPL36A	-0.142	5.4E-03			
CTDNEP1	-0.280	3.7E-05	RPL37	-0.177	1.3E-03			
CYB5R3	-0.232	9.8E-04	RPL37A	-0.164	2.9E-03			
CYC1	-0.220	2.8E-04	RPL4	-0.129	2.8E-04			
DALRD3	-0.334	2.4E-03	RPL6	-0.137	5.5E-04			
DDX27	-0.181	6.2E-03	RPL7	-0.125	2.1E-03			
DGCR2	-0.222	2.3E-03	RPL7A	-0.135	1.7E-04			
DHRS3	-0.329	3.1E-03	RPL8	-0.177	8.8E-04			
DRAP1	-0.249	1.1E-03	RPLP0	-0.200	2.0E-06			
DUSP7	-0.247	5.2E-03	RPLP1	-0.201	1.1E-06			
DYRK1B	-0.306	2.2E-04	RPLP2	-0.167	2.2E-05			
EEF1D	-0.219	1.7E-04	RPS10	-0.122	2.1E-03			
EEF1G	-0.175	1.3E-04	RPS12	-0.154	1.7E-04			
EEF2	-0.191	4.5E-04	RPS13	-0.246	1.8E-07			
EEFSEC	-0.343	2.8E-03	RPS14	-0.170	1.8E-03			

EHMT2	-0.221	5.2E-04	RPS15	-0.199	8.2E-06
EIF3B	-0.185	1.7E-04	RPS15A	-0.164	6.4E-04
EIF3D	-0.264	5.7E-05	RPS16	-0.233	7.1E-08
EIF5A	-0.177	5.8E-03	RPS18	-0.177	3.8E-04
EMC8	-0.230	5.6E-03	RPS19	-0.130	4.4E-03
EPN1	-0.241	7.4E-05	RPS2	-0.182	2.1E-04
ESRRA	-0.225	5.5E-03	RPS20	-0.178	2.2E-05
FAM173A	-0.327	2.8E-03	RPS25	-0.161	8.9E-06
FAM195B	-0.258	2.1E-04	RPS26	-0.193	1.6E-03
FBXO18	-0.206	8.0E-04	RPS28	-0.164	2.9E-04
FBXW5	-0.274	2.7E-03	RPS29	-0.126	3.4E-03
FIBP	-0.206	1.4E-03	RPS3	-0.196	2.1E-04
FIZ1	-0.411	1.5E-05	RPS4X	-0.140	2.0E-03
FKBP11	-0.256	6.2E-03	RPS5	-0.255	3.5E-08
FKBP8	-0.220	1.3E-03	RPS7	-0.152	2.3E-03
FNTB	-0.345	3.6E-03	RPS8	-0.163	2.3E-04
FOXL2	-0.563	1.8E-07	RPS9	-0.215	1.7E-05
FOXP4	-0.274	1.8E-04	RPSA	-0.208	8.7E-07
FRMD8	-0.324	3.2E-05	SALL2	-0.308	4.4E-03
GATA4	-0.287	3.1E-05	SDHB	-0.228	6.2E-04
GCSH	-0.303	4.9E-03	SETD1A	-0.216	3.0E-03
GLIS2	-0.384	1.0E-04	SF3A1	-0.167	6.0E-03
GLTSCR2	-0.185	6.7E-03	SF3B2	-0.152	2.3E-03
GOLGA2	-0.157	3.5E-03	SH2B1	-0.235	5.6E-03
GPAA1	-0.221	6.5E-03	SHARPIN	-0.280	3.0E-03
GPATCH1	-0.265	6.2E-03	SHKBP1	-0.256	1.1E-03
GSK3A	-0.211	1.9E-03	SIX5	-0.280	3.8E-03
GUCD1	-0.297	7.8E-04	SLC25A11	-0.192	4.9E-03
GUK1	-0.215	4.6E-03	SLC25A6	-0.169	6.7E-04
HCFC1R1	-0.315	1.7E-03	SLC35C1	-0.329	4.6E-03
HPS1	-0.264	4.4E-03	SLC52A2	-0.248	8.5E-04
HSF1	-0.247	9.8E-05	SLC9A3R1	-0.338	2.0E-03
IDH3G	-0.275	7.3E-04	SMARCB1	-0.173	2.9E-03
IGF2	-0.419	2.8E-04	SMO	-0.201	2.6E-03
IGFBP7	-0.259	8.0E-04	SND1	-0.217	3.2E-04
IL10RB	-0.216	3.8E-03	SNRNP70	-0.209	9.9E-04
IPO4	-0.193	1.9E-03	SNRPN	-0.226	3.6E-03
JUND	-0.338	1.0E-04	SOD3	-0.311	4.8E-03
KAT8	-0.230	1.3E-03	SPSB3	-0.257	5.9E-03
KATNB1	-0.225	3.7E-03	SREBF1	-0.305	9.1E-05
KDELR1	-0.220	5.9E-04	SSR4	-0.219	2.8E-07
KXD1	-0.212	6.6E-03	SSU72	-0.224	6.0E-03
LOC516108	-0.259	2.1E-03	SUN2	-0.189	3.1E-04
LRRC45	-0.322	5.5E-03	TADA3	-0.266	1.1E-05
MACROD1	-0.336	3.0E-03	TAF10	-0.253	3.6E-04
MAF1	-0.150	2.3E-03	TBCD	-0.240	9.4E-04
MAP1LC3A	-0.269	1.0E-03	TBL3	-0.236	3.2E-03
MAP2K2	-0.202	6.3E-03	TCF25	-0.191	8.2E-04
MARCH2	-0.328	4.8E-03	TECR	-0.256	3.9E-04
MARCKS	-0.355	3.3E-03	THAP4	-0.307	1.5E-04
MARVELD1	-0.242	3.9E-03	TIMM10	-0.257	4.3E-03
MED29	-0.363	4.2E-05	TM9SF4	-0.189	8.6E-04
MEN1	-0.220	2.1E-03	TMEM147	-0.186	4.1E-03
MIF	-0.342	1.3E-03	TMEM8A	-0.206	6.1E-03
MINK1	-0.237	2.3E-03	TMUB1	-0.302	5.1E-03
MMP23B	-0.370	1.4E-03	TONSL	-0.365	3.1E-03
MOSPD3	-0.284	2.8E-03	TP53I13	-0.371	9.2E-04
MRPL10	-0.328	1.1E-05	TRIM11	-0.270	1.7E-03
MRPL57	-0.313	2.2E-04	TRIM28	-0.295	2.3E-08
MRPS2	-0.253	6.6E-03	TRIP6	-0.244	6.6E-03
MT2A	-0.256	1.2E-03	TRMT1	-0.304	9.9E-04
MZF1	-0.347	7.4E-05	TRMU	-0.229	5.6E-04

NAGPA	-0.356	3.0E-04	TSEN34	-0.295	5.0E-04
NAPA	-0.251	1.5E-03	TSR3	-0.307	7.5E-04
NDUFAF3	-0.253	6.4E-03	UBA52	-0.221	1.3E-05
NENF	-0.223	3.5E-04	UBE2S	-0.311	3.8E-04
NME4	-0.225	4.8E-03	UBFD1	-0.212	2.4E-03
NOC2L	-0.198	2.1E-03	UBXN6	-0.216	1.5E-03
NOP2	-0.197	6.7E-03	UQCR11	-0.220	4.8E-03
NPM3	-0.323	6.5E-03	UQCRC1	-0.168	4.3E-03
NR5A1	-0.224	4.3E-03	USE1	-0.372	4.2E-05
NUP62	-0.236	3.6E-03	USF2	-0.216	6.1E-03
NXF1	-0.229	4.9E-03	UTP14A	-0.191	6.1E-03
ORMDL2	-0.249	2.3E-03	VIM	-0.296	1.5E-05
PAK4	-0.232	6.6E-03	VPS16	-0.230	2.8E-03
PAOX	-0.278	3.1E-03	YIF1A	-0.244	3.2E-03
PCBP2	-0.242	4.4E-10	YIPF3	-0.178	2.1E-03
PGP	-0.217	5.4E-03	ZNF444	-0.371	1.2E-04
PHB2	-0.216	8.6E-04	ZNF524	-0.284	4.2E-03
PHKG2	-0.254	1.2E-03	ZNF574	-0.291	4.3E-03
PHRF1	-0.224	2.1E-03	ZNF575	-0.331	4.2E-03
PLCL2	-0.318	9.7E-04	ZNF771	-0.253	2.4E-03
PLEKHH3	-0.304	1.7E-03	ZNF787	-0.277	6.6E-03
PNPLA2	-0.320	1.2E-03			

APÊNDICE J – Vias preditas como reguladas pelos miRNAs que foram exclusivos das células do cumulus nos diferentes grupos de qualidade oocitária. Bioinformática feita com miRNAs humanos de alta similaridade aos miRNAs bovinos (KEEG pathway database).

Vias preditas de serem reguladas pelos miRNAs exclusivos do grupo BL			
KEGG pathway	valor de p	#genes	#miRNAs
Mucin type O-Glycan biosynthesis (hsa00512)	5.97E-12	11	7
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	3.15E-06	65	14
Biosynthesis of unsaturated fatty acids (hsa01040)	3.85E-04	6	4
FoxO signaling pathway (hsa04068)	3.85E-04	49	14
N-Glycan biosynthesis (hsa00510)	6.46E-04	13	11
Hippo signaling pathway (hsa04390)	6.46E-04	40	12
Renal cell carcinoma (hsa05211)	6.46E-04	27	13
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin (hsa00534)	7.41E-04	8	5
Thyroid hormone signaling pathway (hsa04919)	7.41E-04	36	14
Biotin metabolism (hsa00780)	4.70E-03	1	1
Phosphatidylinositol signaling system (hsa04070)	4.70E-03	25	11
ErbB signaling pathway (hsa04012)	4.70E-03	30	14
Protein processing in endoplasmic reticulum (hsa04141)	5.12E-03	47	14
Focal adhesion (hsa04510)	5.72E-03	61	13
Lysine degradation (hsa00310)	5.96E-03	13	12
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (hsa04550)	7.27E-03	42	13
Axon guidance (hsa04360)	7.27E-03	38	14
Glioma (hsa05214)	7.27E-03	21	14
Pathways in cancer (hsa05200)	7.27E-03	106	15
Ras signaling pathway (hsa04014)	9.76E-03	62	14
Non-small cell lung cancer (hsa05223)	1.25E-02	20	14
TGF-beta signaling pathway (hsa04350)	1.82E-02	24	13
Neurotrophin signaling pathway (hsa04722)	2.00E-02	38	14
MAPK signaling pathway (hsa04010)	2.24E-02	69	14
Choline metabolism in cancer (hsa05231)	2.28E-02	32	14
Sphingolipid signaling pathway (hsa04071)	2.56E-02	33	14
Viral carcinogenesis (hsa05203)	3.57E-02	47	14
Endocytosis (hsa04144)	3.57E-02	52	15
cGMP-PKG signaling pathway (hsa04022)	3.81E-02	46	12
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate (hsa00532)	4.31E-02	6	6
Vias preditas de serem reguladas pelos miRNAs exclusivos do grupo CNB			
KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Adherens junction (hsa04520)	2.39E-13	51	11
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	1.22E-10	92	14
TGF-beta signaling pathway (hsa04350)	2.99E-09	45	13
Hippo signaling pathway (hsa04390)	8.53E-08	69	12
Prion diseases (hsa05020)	1.29E-07	10	9
ErbB signaling pathway (hsa04012)	8.24E-07	47	15
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) (hsa05412)	1.14E-04	36	12
Renal cell carcinoma (hsa05211)	1.41E-04	37	15
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (hsa04550)	1.81E-04	64	13
Axon guidance (hsa04360)	2.57E-04	57	15
Morphine addiction (hsa05032)	3.60E-04	39	13
FoxO signaling pathway (hsa04068)	3.99E-04	60	13
Glioma (hsa05214)	6.72E-04	31	13
Rap1 signaling pathway (hsa04015)	6.72E-04	90	15
Pathways in cancer (hsa05200)	8.87E-04	159	14
Bacterial invasion of epithelial cells (hsa05100)	1.40E-03	36	11
GABAergic synapse (hsa04727)	1.70E-03	34	12

Retrograde endocannabinoid signaling (hsa04723)	1.94E-03	49	13
Dopaminergic synapse (hsa04728)	2.56E-03	61	13
Long-term depression (hsa04730)	6.78E-03	29	13
Ras signaling pathway (hsa04014)	6.78E-03	91	15
Glutamatergic synapse (hsa04724)	6.82E-03	49	13
Wnt signaling pathway (hsa04310)	6.94E-03	60	12
Circadian rhythm (hsa04710)	7.26E-03	19	12
Thyroid hormone signaling pathway (hsa04919)	7.26E-03	54	13
Circadian entrainment (hsa04713)	7.26E-03	45	14
Endocytosis (hsa04144)	1.26E-02	83	14
Tight junction (hsa04530)	1.28E-02	58	13
Focal adhesion (hsa04510)	1.28E-02	84	15
MAPK signaling pathway (hsa04010)	1.49E-02	102	13
Amphetamine addiction (hsa05031)	1.49E-02	29	13
AMPK signaling pathway (hsa04152)	1.62E-02	52	14
Ubiquitin mediated proteolysis (hsa04120)	1.73E-02	60	14
Long-term potentiation (hsa04720)	1.78E-02	32	13
Nicotine addiction (hsa05033)	1.95E-02	18	12
Gastric acid secretion (hsa04971)	1.95E-02	36	13
Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810)	2.02E-02	84	15
Chronic myeloid leukemia (hsa05220)	2.03E-02	33	12
Prostate cancer (hsa05215)	2.13E-02	40	14
Phosphatidylinositol signaling system (hsa04070)	2.23E-02	38	12
Neurotrophin signaling pathway (hsa04722)	2.23E-02	50	13
Adrenergic signaling in cardiomyocytes (hsa04261)	2.55E-02	58	14
Endometrial cancer (hsa05213)	2.56E-02	24	11
Oxytocin signaling pathway (hsa04921)	3.33E-02	62	14
Shigellosis (hsa05131)	3.43E-02	30	10
Dorso-ventral axis formation (hsa04320)	3.50E-02	15	10
Estrogen signaling pathway (hsa04915)	3.73E-02	41	14
Prolactin signaling pathway (hsa04917)	3.84E-02	32	13
Lysine degradation (hsa00310)	4.13E-02	17	13
Insulin signaling pathway (hsa04910)	4.18E-02	57	14
Melanoma (hsa05218)	4.18E-02	32	14
Protein processing in endoplasmic reticulum (hsa04141)	4.81E-02	69	14

Vias preditas de serem reguladas pelos miRNAs exclusivos do grupo NC

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	4.93E-10	97	16
Prion diseases (hsa05020)	2.81E-08	13	9
Axon guidance (hsa04360)	5.65E-07	65	15
Pathways in cancer (hsa05200)	7.52E-07	178	17
TGF-beta signaling pathway (hsa04350)	7.71E-07	47	14
Ubiquitin mediated proteolysis (hsa04120)	2.43E-06	71	16
Hippo signaling pathway (hsa04390)	2.43E-06	75	17
Renal cell carcinoma (hsa05211)	3.57E-06	39	12
Adherens junction (hsa04520)	3.45E-05	44	14
ErbB signaling pathway (hsa04012)	8.06E-05	46	16
Ras signaling pathway (hsa04014)	1.16E-04	98	16
Rap1 signaling pathway (hsa04015)	1.27E-04	97	15
FoxO signaling pathway (hsa04068)	3.00E-04	65	14
Sphingolipid signaling pathway (hsa04071)	3.21E-04	58	14
Oxytocin signaling pathway (hsa04921)	3.27E-04	74	14
Glutamatergic synapse (hsa04724)	3.27E-04	53	15
Glioma (hsa05214)	3.31E-04	33	13
Gap junction (hsa04540)	3.98E-04	43	16
Endocytosis (hsa04144)	4.30E-04	92	15
Melanoma (hsa05218)	5.15E-04	39	12
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (hsa04550)	5.15E-04	67	16
Phosphatidylinositol signaling system (hsa04070)	5.47E-04	42	17
Colorectal cancer (hsa05210)	6.20E-04	34	15

Pancreatic cancer (hsa05212)	7.16E-04	37	12
MAPK signaling pathway (hsa04010)	7.16E-04	112	16
Dopaminergic synapse (hsa04728)	7.16E-04	63	16
Focal adhesion (hsa04510)	8.66E-04	93	16
Wnt signaling pathway (hsa04310)	9.98E-04	67	16
Retrograde endocannabinoid signaling (hsa04723)	1.05E-03	51	14
Prostate cancer (hsa05215)	1.14E-03	44	15
Estrogen signaling pathway (hsa04915)	1.59E-03	47	15
Long-term potentiation (hsa04720)	1.76E-03	36	13
Long-term depression (hsa04730)	1.76E-03	31	13
Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810)	2.59E-03	94	15
Neurotrophin signaling pathway (hsa04722)	2.81E-03	57	16
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) (hsa05412)	2.92E-03	32	12
Circadian rhythm (hsa04710)	3.69E-03	19	13
Cocaine addiction (hsa05030)	4.99E-03	22	11
Chronic myeloid leukemia (hsa05220)	6.49E-03	36	13
Dorso-ventral axis formation (hsa04320)	6.65E-03	17	14
Thyroid hormone signaling pathway (hsa04919)	7.09E-03	49	14
Lysine degradation (hsa00310)	7.50E-03	20	11
PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)	8.75E-03	134	16
Non-small cell lung cancer (hsa05223)	8.85E-03	27	11
Amphetamine addiction (hsa05031)	9.05E-03	30	10
Insulin signaling pathway (hsa04910)	1.29E-02	62	14
Morphine addiction (hsa05032)	1.39E-02	38	14
Transcriptional misregulation in cancer (hsa05202)	1.52E-02	77	15
Oocyte meiosis (hsa04114)	1.67E-02	51	12
Acute myeloid leukemia (hsa05221)	1.95E-02	27	13
Inositol phosphate metabolism (hsa00562)	2.81E-02	28	13
mTOR signaling pathway (hsa04150)	2.95E-02	30	13
Prolactin signaling pathway (hsa04917)	3.13E-02	33	13
Biotin metabolism (hsa00780)	3.50E-02	1	1
Adrenergic signaling in cardiomyocytes (hsa04261)	3.50E-02	56	15
Mucin type O-Glycan biosynthesis (hsa00512)	3.52E-02	11	7
Nicotine addiction (hsa05033)	3.52E-02	18	11
cGMP-PKG signaling pathway (hsa04022)	3.52E-02	67	15
RNA transport (hsa03013)	3.76E-02	68	15
Protein processing in endoplasmic reticulum (hsa04141)	3.80E-02	66	15
Bacterial invasion of epithelial cells (hsa05100)	4.05E-02	33	12
Tight junction (hsa04530)	4.05E-02	59	17
cAMP signaling pathway (hsa04024)	4.07E-02	80	15
Thyroid hormone synthesis (hsa04918)	4.30E-02	27	12
GABAergic synapse (hsa04727)	4.30E-02	31	13
Platelet activation (hsa04611)	4.30E-02	52	15
Choline metabolism in cancer (hsa05231)	4.32E-02	45	16

APÊNDICE K – Lista dos mRNAs identificados nas células do cumulus associadas à oócitos com diferentes potenciais em se desenvolver até o estágio de blastocisto, com os valores médios de Ct e desvios padrão.

	NC			CNB			BL			In Vivo		
	Média	Desvio padrão		Média	Desvio padrão		Média	Desvio padrão		Média	Desvio padrão	
ACACA	0.01127	± 0.00109		0.01222	± 0.00149		0.01024	± 0.00277		0.01448	± 0.00369	
ADCY6	0.04729	± 0.01014		0.03826	± 0.01072		0.03495	± 0.01237		0.07953	± 0.03361	
ADCY9	0.00991	± 0.00100		0.00641	± 0.00235		0.00711	± 0.00305		0.01420	± 0.00779	
AGPAT1	0.12246	± 0.00558		0.09823	± 0.01572		0.12880	± 0.05295		0.07334	± 0.02519	
AGPAT9	0.10499	± 0.02446		0.04607	± 0.01160		0.06722	± 0.03013		0.04986	± 0.03649	
AKR1B1	0.11281	± 0.00531		0.09258	± 0.00986		0.09503	± 0.04232		0.03693	± 0.01386	
ATF4	0.07435	± 0.02341		0.05015	± 0.02846		0.03386	± 0.01560		0.07999	± 0.06670	
ATP5L	0.37199	± 0.03228		0.35357	± 0.01887		0.35324	± 0.07644		0.38640	± 0.07902	
BAX	0.04565	± 0.00064		0.03487	± 0.00750		0.03762	± 0.00395		0.03192	± 0.01341	
BDNF	0.00255	± 0.00100		0.00164	± 0.00098		0.00078	± 0.00019		0.00909	± 0.00401	
BID	0.01208	± 0.00153		0.00973	± 0.00138		0.00954	± 0.00240		0.00957	± 0.00775	
CASP3	0.01606	± 0.00157		0.00875	± 0.00292		0.00850	± 0.00341		0.00522	± 0.00184	
CASP9	0.01627	± 0.00139		0.01782	± 0.00230		0.02245	± 0.00992		0.03261	± 0.03268	
CAT	0.05954	± 0.00590		0.05212	± 0.00375		0.05045	± 0.01588		0.02220	± 0.01063	
CD36	0.01160	± 0.00469		0.00899	± 0.00124		0.01392	± 0.00329		0.01229	± 0.00832	
CPT1B	0.00138	± 0.00029		0.00168	± 0.00075		0.00204	± 0.00085		0.00224	± 0.00169	
CPT2	0.03401	± 0.00266		0.03384	± 0.00405		0.04902	± 0.03374		0.02324	± 0.00584	
DDIT3	0.01440	± 0.00244		0.02532	± 0.00941		0.01695	± 0.00670		0.06779	± 0.04152	
DGAT1	0.01788	± 0.00240		0.01274	± 0.00134		0.01340	± 0.00213		0.01066	± 0.00437	
DICER1	0.01166	± 0.00123		0.00939	± 0.00125		0.01328	± 0.00788		0.03775	± 0.01069	
FDX1	0.04281	± 0.00366		0.02879	± 0.00221		0.03669	± 0.00250		0.01512	± 0.01446	
FOXO3	0.01057	± 0.00084		0.01010	± 0.00120		0.00833	± 0.00122		0.01255	± 0.00281	
GFPT2	0.08789	± 0.02070		0.06582	± 0.01658		0.09184	± 0.05714		0.13949	± 0.08852	
GLRX2	0.04297	± 0.00341		0.03135	± 0.00113		0.04002	± 0.01899		0.09725	± 0.05566	
GPX1	0.68628	± 0.05579		0.66092	± 0.18092		0.75390	± 0.09445		1.43309	± 0.35470	
GPX4	0.09364	± 0.00995		0.05244	± 0.01068		0.04489	± 0.00916		0.10010	± 0.02512	
GUCY1B3	0.00450	± 0.00014		0.00302	± 0.00078		0.00277	± 0.00052		0.00274	± 0.00196	
H2AFZ	0.33402	± 0.04548		0.17491	± 0.05324		0.20489	± 0.05157		0.05707	± 0.04959	
H3F3A	0.29384	± 0.06992		0.12967	± 0.02018		0.11830	± 0.05546		0.07202	± 0.05688	
HAS2	0.22191	± 0.04460		0.11289	± 0.03201		0.10479	± 0.04185		0.09169	± 0.13557	
HDAC2	0.06505	± 0.00284		0.04812	± 0.01054		0.06857	± 0.01654		0.02508	± 0.01006	
HMBs	0.02125	± 0.00143		0.01270	± 0.00164		0.01503	± 0.00363		0.01536	± 0.00593	
HPRT1	0.10383	± 0.00837		0.07690	± 0.01682		0.09210	± 0.02765		0.02431	± 0.01090	
HSPA5 (GRP78)	0.84749	± 0.08544		0.61202	± 0.12194		0.55620	± 0.13643		0.35429	± 0.31255	
KRT8	0.04451	± 0.01126		0.08772	± 0.02524		0.14979	± 0.05301		0.08395	± 0.06874	
IMPDH1	0.01769	± 0.00070		0.01236	± 0.00343		0.00833	± 0.00314		0.00474	± 0.00145	
IGFBP4	0.01024	± 0.00041		0.00657	± 0.00040		0.00778	± 0.00339		0.01056	± 0.00032	
IGFBP2	0.01130	± 0.00393		0.00385	± 0.00060		0.01705	± 0.00502		0.04079	± 0.03212	
IGF1R	0.17129	± 0.01699		0.12253	± 0.01250		0.17305	± 0.04162		0.06598	± 0.04238	
NDUFA1	0.02603	± 0.01320		0.03070	± 0.00692		0.03302	± 0.01101		0.01402	± 0.01307	
MTIF3	0.00430	± 0.00063		0.00369	± 0.00132		0.00214	± 0.00101		0.00218	± 0.00171	
LUM	0.09064	± 0.03588		0.10312	± 0.02187		0.14806	± 0.03866		0.02000	± 0.00854	
NOS3	0.00429	± 0.00085		0.00169	± 0.00057		0.00157	± 0.00058		0.01123	± 0.00916	
NOS2	0.04937	± 0.02060		0.04535	± 0.00817		0.03394	± 0.01832		0.00789	± 0.00710	
PGK1	0.11892	± 0.00861		0.13187	± 0.02334		0.12509	± 0.03534		0.22312	± 0.18917	
PFKP	0.03592	± 0.00455		0.03158	± 0.00569		0.03095	± 0.00415		0.12746	± 0.08819	
PDE5A	0.01833	± 0.00153		0.02853	± 0.00335		0.02095	± 0.00464		0.01574	± 0.01509	
NPR2	0.00625	± 0.00229		0.00310	± 0.00165		0.00291	± 0.00063		0.02479	± 0.00679	
PRDX1	0.13561	± 0.01195		0.15962	± 0.04922		0.20852	± 0.12865		0.23734	± 0.13304	
PNPLA2	0.04367	± 0.00402		0.03719	± 0.00447		0.03731	± 0.01043		0.05138	± 0.01736	
PLIN3	0.05393	± 0.00692		0.03191	± 0.00811		0.03336	± 0.00703		0.02847	± 0.00592	
PLIN2	0.25893	± 0.02918		0.24922	± 0.05976		0.30430	± 0.09141		0.45923	± 0.20218	
RPS25	0.05177	± 0.00877		0.03249	± 0.01537		0.02938	± 0.01499		0.02031	± 0.01410	

RPLPO	2.90344	±	0.29002	2.43848	±	0.18330	2.39634	±	0.22469	2.37391	±	0.84532
PTX3	0.40268	±	0.21226	0.09790	±	0.01457	0.33448	±	0.20847	0.56110	±	0.51705
PTGS2	0.02354	±	0.00721	0.01292	±	0.00030	0.02908	±	0.00731	0.04074	±	0.04032
PRDX3	0.03791	±	0.00581	0.03285	±	0.00237	0.04079	±	0.01232	0.02212	±	0.01475
STAT3	0.03972	±	0.00660	0.03028	±	0.00906	0.04408	±	0.00173	0.08785	±	0.08440
SOD1	0.19590	±	0.01478	0.14667	±	0.00751	0.16342	±	0.00970	0.10363	±	0.00774
SLC2A1	0.05762	±	0.00737	0.09439	±	0.02573	0.09836	±	0.02322	0.09739	±	0.02301
SDHA	0.11246	±	0.01391	0.08436	±	0.02780	0.08233	±	0.01797	0.03383	±	0.02298
XBP1	0.08415	±	0.00552	0.07532	±	0.02167	0.08539	±	0.02201	0.10230	±	0.00637
VCAN	4.38962	±	0.40526	3.72664	±	0.86614	3.49265	±	0.68256	2.76941	±	2.51318
TXNRD1	0.02218	±	0.00015	0.01832	±	0.00278	0.01866	±	0.00261	0.04618	±	0.03798
TNFAIP6	0.47320	±	0.08399	0.31929	±	0.07660	0.92391	±	0.08190	1.71950	±	1.07830
TFAM	0.01634	±	0.00226	0.01602	±	0.00398	0.01994	±	0.01088	0.01147	±	0.00427
ADCY3	0.00408	±	0.00036	0.00231	±	0.00011	0.00402	±	0.00018	0.00316	±	0.00286
BCL2	0.01313	±	0.00173	0.01419	±	0.00677	0.00665	±	0.00266	0.01241	±	0.00568
DNMT1	0.05117	±	0.00315	0.02912	±	0.00651	0.03703	±	0.01312	0.01774	±	0.00065
EGFR	0.05268	±	0.01551	0.02539	±	0.01072	0.01998	±	0.00878	0.01280	±	0.00436
FASN	0.08408	±	0.01266	0.05713	±	0.01311	0.05459	±	0.00946	0.02601	±	0.00157
GATM	0.04925	±	0.01023	0.02346	±	0.00397	0.04672	±	0.02834	0.00213	±	0.00192
IMPDH2	0.06010	±	0.00893	0.03399	±	0.01516	0.02022	±	0.01262	0.00948	±	0.01164
NPR3	0.00371	±	0.00101	0.00367	±	0.00120	0.00324	±	0.00138	0.00050	±	0.00010
RPL15	0.10794	±	0.04119	0.05454	±	0.02995	0.06029	±	0.03477	0.04605	±	0.04874
HSPA1A	0.00871	±	0.00380	0.00664	±	0.00192	0.00549	±	0.00262	0.03014	±	0.00869
BMP15	0.00020	±	0.00021	0.00026	±	0.00010	0.00021	±	0.00020	0.02832	±	0.02760
NPR1	0.00090	±	0.00045	0.00030	±	0.00007	0.00064	±	0.00004	0.00172	±	0.00120
AREG	0.00028	±	0.00020	0.00017	±	0.00012	0.00014	±	0.00012			
GREM1	0.00512	±	0.00270	0.00203	±	0.00075	0.00086	±	0.00043			
LPL	0.01693	±	0.00306	0.01786	±	0.00412	0.01697	±	0.00611			
VNN1	0.00412	±	0.00087	0.00507	±	0.00070	0.01172	±	0.01316			
CLIC3	0.00040	±	0.00049	0.00253	±	0.00148	0.00117	±	0.00028			
LIPE	0.00057	±	0.00012	0.00068	±	0.00031	0.00067	±	0.00018			
OOSP1	0.00019	±	0.00016	0.00023	±	0.00009	0.00029	±	0.00014			
SLC2A4	0.00082	±	0.00032	0.00075	±	0.00009	0.00071	±	0.00005			

ANEXO I – Reprodução autorizada do manuscrito intitulado *Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle* no periódico *Reproduction in Domestic Animals*.

Received: 28 February 2017 | Accepted: 6 June 2017

DOI: 10.1111/rda.13021

ORIGINAL ARTICLE

WILEY *Reproduction in Domestic Animals*

Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle

GM Andrade | FV Meirelles | F Perecin* | JC da Silveira*

Veterinary Medicine Department, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil

Correspondence

Juliano Coelho da Silveira, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.
Email: julianodasilveira@usp.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2012/50533-2, 2013/08135-2, 2013/10473-3, 2014/21034-3 and 2014/22887-0; National Council of Technological and Scientific Development (CNPq)

Contents

The ovarian follicle components must provide an ideal environment to ensure the success of reproductive processes, and communication between follicular cells is crucial to support proper oocyte growth. Recently, it has been demonstrated that the presence of extracellular vesicles (EVs) carrying microRNAs (miRNAs) in follicular fluid represents an important autocrine and paracrine communication mechanism inside the ovarian follicle. In this study, we tested the hypothesis that the miRNA content of EVs isolated from ovarian follicular (granulosa and cumulus–oocyte complexes) cell-conditioned culture media is dependent upon cell type. We initially screened bovine granulosa cells (GCs) and cumulus–oocyte complexes (COCs), as well as their derived EVs for 348 miRNAs using real-time PCR, and detected 326 miRNAs in GCs and COCs cells and 62 miRNAs in GCs and COCs EVs. A bioinformatics analysis of the identified cell-specific and differentially expressed miRNAs predicted that they likely modulate important cellular processes, including signalling pathways such as the PI3K-Akt, MAPK and Wnt pathways. By investigating the origins of miRNAs within the follicular fluid, the results of this study provide novel insights into follicular miRNA content and intercellular communication that may be of invaluable use in the context of reproductive technologies, diagnostic of ovarian-related diseases and/or the identification of biomarkers for oocyte and embryo quality.

1 | INTRODUCTION

Intercellular communication within the ovarian follicle is crucial to coordinate the development of a competent oocyte, capable of being fertilized and undergoing embryogenesis. Accordingly, disruption of intercellular communication may lead to infertility and/or congenital malformations (Matzuk, Burns, Viveiros, & Eppig, 2002); thus, accurately understanding the roles of the various ovarian follicle components is essential to prevent and/or treat reproductive problems. Specifically, these ovarian follicle components comprise the follicular fluid (FF), theca, granulosa and cumulus, all of which surround the oocyte (Revelli et al., 2009).

Recently, extracellular vesicles (EVs) (comprising exosomes and microvesicles) identified in the FF were demonstrated to mediate

cell communication (da Silveira, Veeramachaneni, Winger, Carnevale, & Bouma, 2012). EVs contain proteins, mRNAs and miRNAs and are secreted by various cells into different bodily fluids to mediate the exchange of information between cells (Raposo & Stoorvogel, 2013; Valadi et al., 2007). Labelled EVs were reportedly absorbed by equine granulosa cells, as indicated by the observed transfer of their enclosed ACVR1 and miR-27b sequences from immature follicles to the cells of pre-ovulatory follicles (da Silveira, Carnevale, Winger, & Bouma, 2014). Similarly, EVs from small follicles could induce changes in both cumulus morphology and the expression levels of genes associated with cumulus expansion (Hung, Hong, Christenson, & McGinnis, 2015). Notably, these previous studies evaluated EVs from raw FF, including a range of vesicles with different transcripts, rather than isolating vesicles secreted by a specific cell type.

EV contents include miRNAs—non-coding, small RNA molecules (Guo, Ingolia, Weissman, & Bartel, 2010) of approximately 22

*These authors contributed equally to the study.

nucleotides in length, which modulate mRNA levels by binding specific consensus sequences that are usually located in the 3'UTR of their target genes (Bartel, 2009). A single miRNA may regulate several targets; conversely, a single target may be regulated by several miRNAs; thus, it is important to use bioinformatics tools to identify potential redundant effects exerted by multiple genes within a given pathway (Bracken, Scott, & Goodall, 2016). Several signalling pathways are required to regulate ovarian follicle development and oocyte growth (Castañón et al., 2012; Richards et al., 2002; da Silveira, Winger, Bouma, & Carnevale, 2015; Zielak-Steciwko et al., 2014), most of which have been previously found to be associated with specific cell types; nevertheless, communication in ovary follicular cells must be strictly coordinated to ensure the ovulation of a competent oocyte.

The miRNA content of EVs often critically regulates oocyte growth. In this study, we hypothesized that the miRNA content of EVs isolated from a culture medium conditioned by ovarian follicular cells is dependent upon the cell culture composition (e.g. granulosa cells (GCs) versus cumulus-oocyte complexes (COCs)). GCs and COCs were cultured separately, and the expression of selected miRNA was evaluated in extracted cells and EVs, to identify the origin of EVs. The resultant miRNA profiles of the two follicular cell types were found to be different from those of their secreted EVs. A bioinformatics analysis of identified differentially expressed miRNAs revealed them to be associated with the PI3K-Akt, Wnt and MAPK pathways. Thus, the results of this study indicate that despite the observed differences in miRNA expression and EV content, a common set of signalling pathways is predicted to be regulated by specific miRNAs in both follicular cells and EVs.

2 | MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the University of Sao Paulo Research Ethics Committee (protocol number 14.1.674.74.0). Experiments were conducted in strict accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for the Study of Reproduction). Unless otherwise stated, all utilized reagents and culture media were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

2.1 | Follicular dissection and cellular recovery

Bovine ovaries were recovered from the abattoir and maintained in pre-warmed saline solution until follicular dissection. Follicles (diameter 3–6 mm) normally used for in vitro embryo production were dissected and ruptured with 18-G needles under a stereomicroscope. Cell culture experiments and follicular fluid analyses were performed using samples that originated from independent ovary batches.

2.2 | GCs and COCs

Five culture routines were employed, each of which was conducted on GCs/COCs collected from a total of 30 follicles isolated from 30 to 50 pools of ovaries obtained from the same abattoir. GCs and COCs were

collected by dissecting individual follicles under a stereomicroscope. The collected GCs/COCs were divided among three wells of a plate and subjected to culture according to a previously established protocol (Gutiérrez, Campbell, & Webb, 1997; Portela, Zamberlam, & Price, 2010). Loose mural GCs within the FF were collected via centrifugation (300 g, 8 min). Cells in the resulting pellet were eluted with DMEM-F12 supplemented with bovine albumin (1 mg/ml), ITS supplement (100×, 0.1 µl/ml; comprising 1 mg/ml bovine insulin, 0.55 mg/ml human transferrin and 0.5 µg/ml sodium selenite), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml), fungizone (1 mg/ml), MEM non-essential amino acids solution (1.1 mM) and androstenedione (10^{-7} M). Viable cells were counted using trypan blue (Gibco), and approximately 5×10^5 GCs were cultured in a four-well plate (Nunc), in 500 µl of supplemented medium. Likewise, 15 COCs were washed with and then cultured in 500 µl of the supplemented medium in a four-well plate. The culture medium was replaced after 24 h, and follicle-stimulating hormone (FSH; 1 ng/ml) was added to both the GC and COC culture media after 48 h. Cells and media were collected 48 h after FSH treatment and stored at -80°C until RNA extraction.

2.3 | FF collection

Ovarian FF was aspirated from the antral follicles of bovine ovaries with a diameter of 3–6 mm (eight pools of FF/20 ovaries), which were obtained from the abattoir. After FF recovery, samples were processed to isolate EVs as described below.

2.4 | EV isolation

Extracellular vesicles were isolated from GC ($n = 5$) or COC ($n = 5$)-conditioned culture media, and FF ($n = 8$) via differential centrifugation and ultracentrifugation steps, according to a modified version of a previously recommended protocol (Crescitelli et al., 2013). Each sample (4 ml of culture medium or 0.250 ml of FF) was initially subjected to three consecutive centrifugation steps (300 g for 10 min; 2,000 g for 10 min; and 16,500 g for 30 min). The supernatant was then filtered (0.2-µm filter) and ultracentrifuged (100,000 g for 70 min). The generated pellet was washed with 1× phosphate-buffered saline (PBS) and ultracentrifuged (100,000 g for 70 min). To measure the size, concentration and exhibited protein markers of collected EVs, six pellets (comprising three GC-EVs and three COC-EVs) were analysed using the Nanosight instrument (Malvern, UK; Fig. S1), while a second set of pellets was diluted in TRI-reagent BD (Molecular Research Center, Inc.) prior to storage at -80°C .

2.5 | RNA extraction

Total RNA (including mRNAs and miRNAs) was extracted using a TRI-reagent or TRI-reagent BD (Molecular Research Center, Inc.), with some modifications to the manufacturer's instructions. RNA was dissolved in 10 µL of RNase-free water and treated DNase I (Life Technologies) to preclude DNA contamination. RNA concentration was measured from a 1-µl aliquot of the RNA solution, using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) at a wavelength of 260 nm, according to the manufacturer's protocol.

TABLE 1 MicroRNA Ct values and standard deviation (SD) in granulosa cells (GCs) and cumulus-oocyte complexes (COCs)

Cell type	miRNA	Ct value $\pm$ SD	miRNA	Ct value $\pm$ SD
GCs	bta-miR-367	35.43 $\pm$ 0.31	bta-miR-543	34.69 $\pm$ 1.56
	bta-miR-449a	33.13 $\pm$ 4.72	bta-miR-653	35.33 $\pm$ 2.07
	bta-miR-451	28.47 $\pm$ 2.30	bta-miR-759	35.18 $\pm$ 1.03
	bta-miR-539	35.43 $\pm$ 0.52	bta-miR-875	36.60 $\pm$ 0.47
COCs	bta-miR-105a	30.58 $\pm$ 1.64	bta-miR-329b	35.32 $\pm$ 0.93
	bta-miR-126-3p	30.35 $\pm$ 3.09	bta-miR-365-5p	30.41 $\pm$ 2.70
	bta-miR-137	35.15 $\pm$ 2.43	bta-miR-369-5p	31.30 $\pm$ 3.88
	bta-miR-142-3p	34.70 $\pm$ 0.92	bta-miR-371	34.57 $\pm$ 0.63
	bta-miR-200a	35.04 $\pm$ 1.72	bta-miR-374b	28.44 $\pm$ 1.49
	bta-miR-218	35.96 $\pm$ 1.30	bta-miR-495	35.89 $\pm$ 0.35
	bta-miR-219-5p	35.83 $\pm$ 0.10	bta-miR-544b	32.18 $\pm$ 1.28
	bta-miR-329a	36.06 $\pm$ 0.97	bta-miR-562	33.65 $\pm$ 0.20

Each Ct value represents the average value for that group.

2.6 | MicroRNAs analysis

Briefly, reverse transcription was conducted on the total RNA (100 ng) using the miScript PCR Starter Kit (Qiagen, Venlo & Limburg, the Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The levels of 348 miRNAs and the (control) housekeeping genes *miR-99b*, *RNU1* and *RNU43* were established via real-time (RT)-PCR, using 10 μ l QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix reagent (Qiagen, Venlo & Limburg, the Netherlands), 10 μ M each of the universal reverse primer (Qiagen, Venlo & Limburg, the Netherlands) and miRNA-specific primers (Table S1), and 0.1 μ l cDNA. RT-PCR was conducted in a 96-well plate, using the ABI-7500 RT-PCR System (Applied Biosystems). The PCR cycling conditions comprised 95°C for 5 min, 45 cycles of 95°C for 10 s, 55°C for 15 s and 72°C for 15 s, followed by a melting curve analysis to confirm the specificity of cDNA amplification. To identify differences between GC and COC miRNA profiles, Ct values were normalized to the geometric mean expression levels of *miR-99b*, *RNU1* and *RNU43*. To identify differential miRNA expression between GC-EVs and COC-EVs, Ct values were normalized to the geometric mean expression levels of *miR-99b* and *RNU1* only. GC, COC, GC-EVs and COC-EVs samples were analysed in triplicate, and only miRNAs with a Ct value less than 37, and that were detected in at least two of the three samples in each group, were considered to be present. Eight FF samples were analysed and only miRNAs with a Ct value less than 37 and that were detected in at least four samples were considered to be present. Data were displayed as the mean $\pm$ SD of replicate samples. Statistical analyses were performed using SAS 9.3 Software (SAS Institute). A Student's *t* test was used to assess statistical differences, and normality was verified using a Shapiro-Wilk test, where a statistical difference of 5% was considered to be significant.

2.7 | Bioinformatics analyses of miRNAs according to their cellular origin

Bioinformatics analyses were performed to identify miRNA-controlled pathways in follicular cells and their secreted EVs. Homology between

bovine and human miRNA sequences was determined using miRBase software, and likely associated signalling pathways were identified using DIANA tools software.

3 | RESULTS

3.1 | miRNA profiles of follicular cells

In total, 326 miRNAs were detected (Table S2A), including 302 observed in both GCs and COCs, eight specifically present in GCs and 16 observed only in COCs (Table 1). The expression of 10 of these miRNAs was increased in COCs, namely *let7a-3p* ($p = .029$), *miR-128* ($p = .050$), *miR-15b* ($p = .027$), *miR-196b* ($p = .008$), *miR-342* ($p = .036$), *miR-411a* ($p = .046$), *miR-497* ($p = .036$), *miR-502b* ($p = .035$), *miR-542-5p* ($p = .005$) and *miR-592* ($p = .010$; Figure 1a–j). Conversely, *miR-454* expression was decreased in COCs ($p = .038$; Figure 1k).

3.2 | miRNA profiles of EVs from conditioned culture media

RNA extraction and RT-PCR analysis of EVs recovered from GC- or COC-conditioned culture media identified a total of 67 detectable miRNAs (Table S2B), including 24 common to both EV sample types, 13 specifically detected in GC-EVs and 30 only observed in COC-EVs (Table 2). The expression of two miRNAs, *miR-127* and *miR-433*, was increased in GC-EVs ($p = .035$ and $p = .047$, respectively, Figure 2a and c), while *miR-631* and *miR-323* expression was increased in COC-EVs ($p = .033$ and $p = .023$, respectively, Figure 2b and d).

3.3 | Bioinformatics analyses of miRNAs

Bioinformatics analyses were performed using the identified cell-type- and EV-origin-specific miRNAs to identify miRNA-regulated pathways involved in follicle development and oocyte competence. We analysed bovine miRNAs with reference to homologous human miRNA sequences (Table S3) and grouped the miRNAs according to their

FIGURE 1 Relative levels of microRNAs differentially expressed between granulosa cells (GC) and cumulus-oocyte complexes (COC). (a–j) MicroRNAs that exhibited increased expression in COCs. (k) MicroRNAs that exhibited decreased expression in COCs. Bars represent mean data values, and error bars represent standard deviation. Superscripts (a, b) indicate statistically significant differences ($p < .05$)

cellular origin for analysis using the mirpath analysis package from DIANA tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools>).

The conducted functional enrichment analysis identified 69 and 94 signalling pathways that were predicted to be regulated by the eight GC-specific and 16 COC-specific miRNAs, respectively. This list of identified pathways was refined to include only those pathways associated with reproductive processes, of which the 10 most relevant were ranked according to the number of involved target genes and their associated p -value (Figure 3a and b). Similarly, pathways regulated by miRNAs that were identified to be differentially expressed between GCs and COCs are shown in Figure 3c and d.

In addition, 13 GC-EV-specific and 30 COC-EV-specific miRNA were predicted to regulate 58 and 100 pathways, respectively. Again,

this list was refined to include only those pathways associated with reproductive functions, and these most relevant pathways then ranked (Figure 4a and b). Likewise, pathways associated with reproductive functions that were predicted to be regulated by miRNAs identified to be differentially expressed between GC-EVs and COC-EVs are shown in Figure 4c and d.

3.4 | miRNA profiles of EVs derived from FF versus follicular cell-conditioned culture medium

We compared the miRNA content of EVs extracted from cultured follicular cells with those isolated from FF. We identified 196 miRNAs (<37 Ct) in EVs from FF (Table S4), of which

TABLE 2 MicroRNA Ct values and standard deviation (SD) in extracellular vesicles isolated from granulosa cell (GC-EVs) and cumulus-oocyte complex (COC-EVs)-conditioned cell culture media

EVs origin	miRNA	Ct value $\pm$ SD	miRNA	Ct value $\pm$ SD
GC-EVs	bta-miR-125b	34.84 $\pm$ 2.52	bta-miR-370	35.66 $\pm$ 1.83
	bta-miR-130b	34.92 $\pm$ 1.01	bta-miR-502b	36.14 $\pm$ 1.30
	bta-miR-132	36.45 $\pm$ 0.28	bta-miR-760-3p	33.40 $\pm$ 0.96
	bta-miR-154b	34.08 $\pm$ 0.50	bta-miR-885	34.97 $\pm$ 1.42
	bta-miR-155	35.06 $\pm$ 0.14	bta-miR-143	34.95 $\pm$ 0.13
	bta-miR-27a-5p	27.27 $\pm$ 7.78	bta-miR-197	34.26 $\pm$ 2.50
COC-EVs	bta-miR-29d-5p	34.36 $\pm$ 0.94		
	bta-let-7e	32.83 $\pm$ 1.86	bta-miR-16b	33.10 $\pm$ 2.14
	bta-let-7f	34.45 $\pm$ 1.91	bta-miR-187	34.26 $\pm$ 1.38
	bta-let-7i	34.61 $\pm$ 2.34	bta-miR-210	33.86 $\pm$ 2.66
	bta-miR-1	35.61 $\pm$ 0.52	bta-miR-25	35.07 $\pm$ 1.61
	bta-miR-100	34.27 $\pm$ 1.73	bta-miR-26a	33.81 $\pm$ 1.00
	bta-miR-101	35.30 $\pm$ 0.63	bta-miR-30c	36.50 $\pm$ 0.50
	bta-miR-106a	34.41 $\pm$ 2.10	bta-miR-339b	35.12 $\pm$ 0.24
	bta-miR-124b	34.84 $\pm$ 1.38	bta-miR-346	33.54 $\pm$ 1.92
	bta-miR-125a	34.18 $\pm$ 1.88	bta-miR-378b	34.98 $\pm$ 0.60
	bta-miR-129	34.66 $\pm$ 1.91	bta-miR-425-3p	29.46 $\pm$ 4.60
	bta-miR-133a	32.78 $\pm$ 2.06	bta-miR-453	34.95 $\pm$ 0.98
	bta-miR-145	33.29 $\pm$ 2.42	bta-miR-665	31.20 $\pm$ 2.71
	bta-miR-149-3p	30.64 $\pm$ 4.39	bta-miR-874	33.87 $\pm$ 0.82
	bta-miR-149-5p	33.14 $\pm$ 4.73	bta-miR-877	32.88 $\pm$ 1.09
	bta-miR-15a	33.60 $\pm$ 1.14	bta-miR-940	28.43 $\pm$ 4.07

Each Ct value represents the average value for that group.

FIGURE 2 Relative levels of microRNAs differentially expressed between extracellular vesicles derived from granulosa cells and cumulus-oocyte complexes (GC-EVs and COC-EVs, respectively). (a) and (c) MicroRNAs whose expression was increased in GC-EVs. (b) and (d) MicroRNAs whose expression was increased in COC-EVs. Bars represent mean data values, and error bars represent standard deviation. Superscripts (a, b) indicate statistically significant differences ($p < .05$)

61 were also expressed by EVs recovered from follicular cell-conditioned culture medium. Interestingly, six miRNAs identified in the EVs derived from the follicular cell-conditioned culture medium were not found in the FF-derived EVs, while 130 miRNAs were detected in the FF-derived EVs only. The list of

miRNAs identified in GCs, COCs, GC-EVs, COC-EVs, and FF-EVs is shown in Table S5. Additionally, we determined the number of miRNAs detected in each follicular compartment and found that all FF-EVs miRNAs were detected in another analysed follicular compartment (Figure 5).

FIGURE 3 The number of genes and enrichment factor [$-\log_{10}(p \text{ value})$] of the most relevant pathways regulated by the miRNAs identified (a) exclusively in granulosa cells (GCs), (b) exclusively in cumulus–oocyte complexes (COCs), (c) to exhibit increased expression in GCs and (d) to exhibit increased expression in COCs

4 | DISCUSSION

In the present study, we evaluated miRNA levels in follicular cells (GCs and COCs) and their secreted EVs. Initially, we characterized the different miRNA profiles of GCs, COCs and EVs. Despite marked variations in miRNA expression, we observed that the miRNAs identified

in GCs, COCs and EVs were predicted to regulate a common set of signalling pathways associated with follicle and oocyte development. Finally, we compared the miRNA profiles of EVs collected from follicle cell-conditioned culture medium with those derived from FF.

We observed that 11 miRNAs were differentially expressed between the two follicular cell types. These included one miRNA, *miR-15b*, which was increased in COC cells, and that has been strongly

FIGURE 4 The number of genes and enrichment factor [$-\log_{10}(p \text{ value})$] of the most relevant pathways regulated by the miRNAs found (a) exclusively in extracellular vesicles from granulosa cells (GC-EVs), (b) exclusively in extracellular vesicle from cumulus-oocyte complexes (COC-EVs), (c) to exhibit increased expression in GC-EVs and (d) to exhibit increased expression in COC-EVs

validated in previous bovine studies (according to the miRTarBase database (<http://mirtarbase.mbc.ntu.edu.tw/index.php>)), and found to be negatively regulated by FSH in murine GCs (Yao et al., 2009). In this study, both GCs and COCs were exposed to FSH in vitro; however, the increase in *miR-15b* expression suggests that the GCs responded more strongly to this treatment. Other identified differentially expressed miRNAs that exhibited increased expression levels in COCs in this study, such as *miR-342* and *miR-542-5p*, were recently identified in EVs from bovine FF and found to be more highly expressed in large than in small follicles (Navakanitworakul et al., 2016). Similarly, *let-7a-3p* and *miR-542-5p*, whose expression was found to be increased in COCs

compared to in GCs in this study, were previously determined to be down- and upregulated, respectively, in granulosa cells from bovine pre-ovulatory compared to in subordinated follicles (Gebremedhin et al., 2015). Together, these results suggest that *let-7a-3p* and *miR-542-5p* likely play a different role in COCs, which is independent of the follicle stage. Additionally, in this study, several miRNAs were detected found to be GC- or COC-specific. Of the GC-specific miRNAs, *miR-449a* (Yao et al., 2015) and *miR-451* (Li, Zhang, Cai, & Bian, 2013; Tian et al., 2012) are reportedly associated with the PI3K-Akt signalling pathway, while *miR-449a* was recently found to be associated with Wnt signalling (Noferesti et al., 2015). Of the COC-specific miRNAs, *miR-105* (Shen

FIGURE 5 Venn diagram depicting the number of miRNAs detected in granulosa cells (GCs), cumulus-oocytes complexes (COCs), extracellular vesicles isolated from culture media conditioned by either granulosa cells (GC-EVs) or cumulus-oocyte complexes (COC-EVs), and extracellular vesicles isolated from follicular fluid (FF-EVs)

et al., 2014), *miR-126* (Kim et al., 2014) and *miR-200a* (Becker, Takwi, Lu, & Li, 2009) were previously associated with the PI3K-Akt signalling pathway, *miR-218* and *miR-219-5p* were found to be associated with the Wnt signalling pathway (Hu et al., 2017; Li, Dong, Han, & Zhang, 2017), and *miR-126* was determined to be associated with MAPK signalling (Chakraborty, Sharma, & Patra, 2016). Similarly, the association between follicular development and miRNA-controlled signalling pathways such as the PI3K-Akt, Wnt and MAPK signalling pathways has been demonstrated in both theca and GCs (Zielak-Steciwo et al., 2014). Thus, the present results suggest that the identified miRNAs are secreted in a cell-specific manner and are involved in the regulation of signalling pathways important for ovarian follicular development.

We next identified four miRNAs that were differentially expressed between EVs that were isolated from cell culture media conditioned by GCs and COCs. *miR-127* and *miR-433* were more highly expressed in GC-EVs, while *miR-631* and *miR-323* were more highly expressed in COC-EVs. *miRNA-127* exhibited increased expression on day 7 of the bovine oestrous cycle in serum exosomes (Noferesti et al., 2015); similarly, *miRNA-433* expression increased in exosomes isolated from the FF of young compared to aged mares (da Silveira et al., 2012). Finally, exosomal *miR-323* present in exosomes from human FF is associated with high-quality embryos (Feng et al., 2015). In this study, a comparison of the miRNAs exclusively detected in EVs according to their cellular origin revealed 13 GC-specific and 30 COC-specific miRNAs, suggesting that the two cell types secrete a different EVs miRNA cargo. Three COC-EV miRNAs, *miR-378*, *miR-106a* and *miR-let-7f*, have been associated with GC culture at a high plate density; thus, they were suggested to regulate genes involved in bovine follicle growth, and granulosa proliferation and function (Yenuganti, Baddela, Baufeld, Singh, & Vanselow, 2015).

Despite this association, herein we maintained a GC and COC density of 5×10^5 cells/well and 10/well, respectively, suggesting that an alternative mechanism may have regulated these miRNA levels. Two COC-EV miRNAs, *miR-132* and *miR-155*, have been previously described as being enriched in exosomes compared to in the non-exosomal portion of FF (Sohel et al., 2013); conversely, the COC-EV *miR-365-5p*, and the GC-EV *miR-101*, *miR-133*, *miR-145* and *miR-15a*, are reportedly enriched in the non-exosomal compared to in the exosomal portion of FF (Sohel et al., 2013). However, in this study, we only evaluated the miRNAs within EVs. Nevertheless, these results validate our hypothesis that miRNAs are included within FF-EVs according to their cellular origin. The loading of EV components is often known to be vesicular and/or cell-type-specific (Abels & Breakefield, 2016). Additionally, the loading of human miRNAs into EVs has been demonstrated to be influenced by the presence of sequence-specific motifs present in the miRNAs themselves (Villarroya-Beltri et al., 2013). A similar mechanism in bovine species has not yet been investigated. The cell-specific differences in EV miRNAs observed in this study demonstrate that EV-mediated intercellular communication in this context is modulated by cellular origin; however, further study focused on the various follicular components (CCs, GCs, oocyte and FF) is necessary to elucidate this mechanism.

Finally, we compared the miRNA profiles of EVs isolated from GC- and COC-conditioned culture media with those of EVs isolated from FF and found them to be similar. miRNAs in FF are released by ovarian follicle rather than blood cells, demonstrating high level of communication between follicular cells (Santonocito et al., 2014). However, in this study, 130 miRNAs detected in FF-EVs were not detected in EVs isolated from conditioned culture media. This may be because FF acts as a reservoir during follicular development in vivo, and, thus, may exhibit characteristics associated with both past and present follicular developmental events (Revelli et al., 2009) that are not evaluated in vitro.

In summary, the present study investigated the levels of EV miRNAs secreted into cell culture media by GCs and COCs. Bioinformatics analyses demonstrated that despite the observed differences in miRNA expression between the follicular cell types and their respective EVs, a common set of signalling pathways is predicted to be regulated by both of miRNA networks. This strongly suggests that EV miRNAs critically mediate the intricate crosstalk that occurs between follicular cells. Further study is necessary to elucidate the exact roles of these messages during follicle development; however, we suggest that the presence of EVs within FF may facilitate the exchange of information between different follicular cell types, thus promoting oocyte competence.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the University of São Paulo for the infrastructure and support to develop the experiments. This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP grants 2014/21034-3, 2014/22887-0, 2013/10473-3, 2013/08135-2 and 2012/50533-2) and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GMA, FVM, FP and JCS designed the experiments. GMA and JCS collected the samples and performed the experiments. GMA, JCS and FP analysed the data and wrote the manuscript. All authors discussed the study results and reviewed and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36, 301–312.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215–233.
- Becker, L. E., Takwi, A. L., Lu, Z., & Li, Y. (2009). The role of miR-200a in mammalian epithelial cell transformation. *Carcinogenesis*, 30, 2–12.
- Bracken, C. P., Scott, H. S., & Goodall, G. J. (2016). A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 17, 719–732.
- Castañón, B. I., Stapp, A. D., Gifford, C. A., Spicer, L. J., Hallford, D. M., & Hernandez Gifford, J. A. (2012). Follicle-stimulating hormone regulation of estradiol production: Possible involvement of wnt2 and β -catenin in bovine granulosa cells. *Journal of Animal Science*, 90, 3789–3797.
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., & Patra, B. C. (2016). MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*, 7, 42683–42697.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabo, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., ... Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 1–10. <http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/20677/30150>
- Feng, R., Sang, Q., Zhu, Y., Fu, W., Liu, M., Xu, Y., ... Wang, L. (2015). MiRNA-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro. *Scientific Reports*, 5, 8689. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4346788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gebremedhin, S., Salilew-Wondim, D., Ahmad, I., Sahadevan, S., Hossain, M. M., Hoelker, M., ... Tesfaye, D. (2015). MicroRNA expression profile in bovine granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle. *PLoS ONE*, 10, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125912>
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466, 835–840. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703300>
- Gutiérrez, C. G., Campbell, B. K., & Webb, R. (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*, 56, 608–616.
- Hu, F., Sun, B., Xu, P., Zhu, Y., Meng, X.-H., Teng, G.-J., & Xiao, Z.-D. (2017). MiR-218 induces neuronal differentiation of ASCs in a temporally sequential manner with fibroblast growth factor by regulation of the Wnt signaling pathway. *Scientific Reports*, 7, 39427. <http://www.nature.com/articles/srep39427>
- Hung, W.-T., Hong, X., Christenson, L. K., & McGinnis, L. K. (2015). Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biology of Reproduction*, 93, 117. <http://www.biolreprod.org/content/early/2015/10/14/biolreprod.115.132977.abstract>
- Kim, W., Lee, Y., McKenna, N. D., Yi, M., Simunovic, F., Wang, Y., ... Sonntag, K. C. (2014). MiR-126 contributes to Parkinson's disease by dysregulating the insulin-like growth factor/phosphoinositide 3-kinase signaling. *Neurobiology of Aging*, 35, 1712–1721. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.021>
- Li, C., Dong, J., Han, Z., & Zhang, K. (2017). MicroRNA-219-5p represses the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by targeting the LRH-1/Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Research*, 25, 617–627.
- Li, H. Y., Zhang, Y., Cai, J. H., & Bian, H. L. (2013). MicroRNA-451 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via downregulation of PI3K/Akt pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, 3631–3634. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23886157
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., & Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science*, 296, 2178–2180. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077402
- Navakanitworakul, R., Hung, W.-T., Gunewardena, S., Davis, J. S., Chotigeat, W., & Christenson, L. K. (2016). Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. *Scientific Reports*, 6, 25486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158133> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4860563>
- Noferesti, S. S., Sohel, M. M. H., Hoelker, M., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., ... Tesfaye, D. (2015). Controlled ovarian hyperstimulation induced changes in the expression of circulatory miRNA in bovine follicular fluid and blood plasma. *Journal of Ovarian Research*, 8, 81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26645573> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4673782&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Portela, V. M., Zamberlam, G., & Price, C. A. (2010). Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 93, 2050–2055.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200, 373–383.
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: From single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 40. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2685803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., ... Sharma, S. C. (2002). Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 195–220.
- Santonocito, M., Vento, M., Guglielmino, M. R., Battaglia, R., Wahlgren, J., Ragusa, M., ... Di Pietro, C. (2014). Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: Bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertility and Sterility*, 102, 1751–1761. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.005>
- Shen, G., Rong, X., Zhao, J., Yang, X., Li, H., Jiang, H., ... Jia, H. (2014). MicroRNA-105 suppresses cell proliferation and inhibits PI3K/AKT signaling in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 35, 2748–2755.
- da Silva, J. C., Carnevale, E. M., Winger, Q. A., & Bouma, G. J. (2014). Regulation of ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 44.
- da Silva, J. C., Veeramachaneni, D. N. R., Winger, Q. A., Carnevale, E. M., & Bouma, G. J. (2012). Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, 86, 71.
- da Silva, J. C., Winger, Q. A., Bouma, G. J., & Carnevale, E. M. (2015). Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- β signalling during follicle development in

- the mare. *Reproduction, Fertility, and Development*, 27, 897–905. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945781>
- Sohel, M. M. H., Hoelker, M., Noferesti, S. S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., ... Tesfaye, D. (2013). Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS ONE*, 8, e78505.
- Tian, Y., Nan, Y., Han, L., Zhang, A., Wang, G., Jia, Z., ... Kang, C. (2012). MicroRNA miR-451 downregulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma. *International Journal of Oncology*, 40, 1105–1112.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9, 654–659.
- Villarroya-Beltrí, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., ... Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, 4, 2980. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3905700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yao, N., Lu, C., Zhao, J., Xia, H., Sun, D., Shi, X., ... Ma, X. (2009). A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH. *Frontiers in Bioscience*, 14, 3239–3245.
- Yao, Y., Ma, J., Xue, Y., Wang, P., Li, Z., Li, Z., ... Liu, Y. (2015). MiR-449a exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma by targeting Myc-associated zinc-finger protein. *Molecular Oncology*, 9, 640–656.
- Yenuganti, V. R., Baddela, V. S., Baufeld, A., Singh, D., & Vanselow, J. (2015). The gene expression pattern induced by high plating density in cultured bovine and buffalo granulosa cells might be regulated by specific miRNA species. *Journal of Reproduction and Development*, 61, 154–160.
- Zielak-Steciwo, A. E., Browne, J. A., McGettigan, P. A., Gajewska, M., Dziecioł, M., Szulc, T., & Evans, A. C. O. (2014). Expression of microRNAs and their target genes and pathways associated with ovarian follicle development in cattle. *Physiological Genomics*, 46, 735–745.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Andrade GM, Meirelles FV, Perecin F, da Silveira JC. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. *Reprod Dom Anim*. 2017;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/rda.13021>

ANEXO II – Reprodução autorizada do manuscrito intitulado *The Role of the PI3K-Akt Signaling Pathway in the Developmental Competence of Bovine Oocytes* no periódico *PLoS One*.

RESEARCH ARTICLE

The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes

Gabriella Mamede Andrade¹*, Juliano Coelho da Silveira¹*, Claudia Perrini², Maite Del Collado¹, Samuel Gebremedhn³, Dawit Tesfaye³, Flávio Vieira Meirelles¹†, Felipe Perecin¹‡*

1 Veterinary Medicine Department, Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of Sao Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil, **2** Large Animal Hospital, Reproduction Unit, Università degli Studi di Milano, Lodi, Italy, **3** Institute for Animal Sciences (ITW), University of Bonn, Bonn, Germany

* These authors contributed equally to this work.

† These authors also contributed equally to this work.

* fperecin@usp.br

OPEN ACCESS

Citation: Andrade GM, da Silveira JC, Perrini C, Del Collado M, Gebremedhn S, Tesfaye D, et al. (2017) The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. *PLoS ONE* 12(9): e0185045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185045>

Editor: Meijia Zhang, China Agricultural University, CHINA

Received: January 10, 2017

Accepted: September 4, 2017

Published: September 18, 2017

Copyright: © 2017 Andrade et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP grants 2014/21034-3; 2014/22887-0; 2013/08135-2 and 2012/50533-2). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The ovarian follicle encloses oocytes in a microenvironment throughout their growth and acquisition of competence. Evidence suggests a dynamic interplay among follicular cells and oocytes, since they are constantly exchanging “messages”. We dissected bovine ovarian follicles and recovered follicular cells (FCs—granulosa and cumulus cells) and cumulus-oocyte complexes (COCs) to investigate whether the PI3K-Akt signaling pathway impacted oocyte quality. Following follicle rupture, COCs were individually selected for *in vitro* cultures to track the follicular cells based on oocyte competence to reach the blastocyst stage after parthenogenetic activation. Levels of PI3K-Akt signaling pathway components in FCs correlated with oocyte competence. This pathway is upregulated in FCs from follicles with high-quality oocytes that are able to reach the blastocyst stage, as indicated by decreased levels of *PTEN* and increased levels of the *PTEN* regulators bta-miR-494 and bta-miR-20a. Using PI3K-Akt responsive genes, we showed decreased *FOXO3a* levels and *BAX* levels in lower quality groups, indicating changes in cell cycle progression, oxidative response and apoptosis. Based on these results, the measurement of levels of PI3K-Akt pathway components in FCs from ovarian follicles carrying oocytes with distinct developmental competences is a useful tool to identify putative molecular pathways involved in the acquisition of oocyte competence.

Introduction

The success of *in vitro* production of bovine embryos is closely associated with oocyte quality [1, 2]. The oocyte’s competence to reach the blastocyst stage is progressively acquired during follicle growth [3], and is the result of interactions between external factors and the follicular microenvironment [4]. The ovarian follicle is composed of three cell types in addition to the

oocyte, theca, granulosa, and cumulus cells, along with a basement membrane and follicular fluid. Each one of these cell types plays an active role in oocyte differentiation and regulation [5]. Due to its complexity, a reliable method for measuring oocyte competence prior to phenotype analysis following fertilization is not available.

Several morphological, ultrastructural, and metabolic criteria have been used to predict oocyte competence. These morphological criteria remain subjective and, in some cases, are invasive and/or poorly correlated with oocyte competence. Identification of other relevant biomarkers to accurately predict oocyte quality is the primary goal [6]. The appropriate interplay between oocyte and follicular cells (FCs) is indispensable for proper folliculogenesis, oocyte development, and progression to ovulation, as well as subsequent embryo development [7]. Hence, an understanding of the different signaling pathways in FCs that modulate oocyte competence is important for unravelling the key intracellular events driving oocyte competence acquisition.

The phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) pathway plays a key role in cellular responses to cell proliferation, apoptosis, DNA repair, and protein synthesis. Based on accumulating evidence, PI3K-Akt signaling is associated with ovarian function, including the recruitment of primordial follicles, granulosa proliferation, corpus luteum survival, and oocyte maturation [8–10]. PI3K-Akt regulators have several functions, including the upregulation of Akt activity by its phosphorylation as a result of PI3K upregulation and downregulation by PTEN (phosphatase homologous to tensin). Additionally, miRNAs are also involved in the regulation of PI3K-Akt signaling, representing an additional layer of complexity in the system regulating this pathway [11]. Specifically, some miRNAs, such as miR-494 and miR-20a, have been shown to exert modulatory effects on *PTEN* levels and, thus, on genes downstream of the PI3K-Akt pathway [12, 13].

Here, we investigated the hypothesis that oocyte competence is associated with alterations in levels of PI3K-Akt pathway components and their regulatory miRNAs during follicle development. Therefore, we dissected ovarian follicles and retrieved FCs and cumulus-oocyte complexes (COCs). We placed the COCs in individual droplets and tracked maturation and parthenogenetic development until the blastocyst stage was reached. Then, we further determined the levels of PI3K-Akt components in previously collected FCs from the original follicles and correlated their levels with the oocyte's competence to mature and support early development. We determined the levels of genes downstream of PI3K-Akt signaling that are related to different cellular processes (i.e., protein synthesis, DNA repair, cell cycle progression, and apoptosis), as well as the levels of the *PTEN* regulators bta-miR-494 and bta-miR-20a. We also validated the interaction between bta-miR-494 and the bovine *PTEN* 3'UTR (untranslated region) using a luciferase assay. Based on our results, the PI3K-Akt pathway is differentially regulated in FCs, and, as a result, potentially drives oocyte competence.

Materials and methods

This study was approved by the University of São Paulo Research Ethics Committee (Protocol number 14.1.674.74.0). Experiments were conducted in accordance with International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for the Study of Reproduction). Unless indicated otherwise, the reagents and culture media used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

We developed an experimental model based on the individual maturation of oocytes and culture of embryos to determine the levels of PI3K-Akt pathway components in FCs from follicles containing oocytes with distinct development capacities. After maturation and embryo development, FCs were grouped according to oocyte competence. Prior to oocyte maturation,

ovarian follicles were dissected, FCs (regardless of cell types) were obtained after centrifugation of the follicular fluid and stored for further use, and COCs were collected for individual IVM and embryo culture after parthenogenetic activation. At the end of the IVM, oocytes were denuded and classified depending on the presence or absence of first polar body in mature (IVM+) or non-mature (IVM-) oocytes, respectively. Regardless of the maturation status, individual denuded oocytes were activated parthenogenetically and placed in a droplet for embryo development *in vitro*. Embryos (zygotes) from the IVM+ group without signs of embryonic cleavage were classified as the 'non-cleaved' (NC group). Embryos that started to develop (cleaved) but stopped before reaching the blastocyst stage were classified as the 'cleaved non-blastocyst' (CNB group), whereas embryos that had reached the blastocyst stage comprised the 'blastocyst' group (BL group). FCs from NC, CNB, and BL groups were used to determine the levels of PI3K-Akt pathway components in samples from follicles containing oocytes with different developmental capacities.

Oocyte maturation, parthenogenetic activation, and single embryo culture

Ovaries were recovered from slaughterhouses and maintained in a pre-warmed saline solution until follicular dissection. Follicles ranging between 3 to 6 mm diameter in size were dissected. After follicle rupture, COCs were collected for single embryo culture, as described above, and FCs were collected, washed by centrifugation (600 x g) to remove the follicular fluid, and immediately placed in liquid nitrogen for future analyses of the PI3K-Akt pathway components to retrospectively determine the follicle of origin. The COCs recovered after follicle dissection were washed with 25 mM HEPES-buffered tissue culture medium-199 (TCM-199; GIBCO, Gaithersburg, MD, EUA) supplemented with 10% (v/v) FCS, 0.2 mM sodium pyruvate, and 50 µg/mL gentamicin.

COCs were matured in individual 9 µL drops of maturation medium (TCM-199) buffered with bicarbonate and supplemented with 10% FCS, 0.2 mM sodium pyruvate, 50 µg/mL follicle stimulating hormone (FSH; Folltropin-V, Bioniche Animal Health Belleville, Canada), and 50 µg/mL human chorionic gonadotropin (hCG) (Vetcore[®], Hertape Calier), under mineral oil in a 38.5°C incubator with 5% CO₂ in air.

After 19 hours of IVM, oocytes were individually denuded in 0.2% hyaluronidase in Ca²⁺- and Mg²⁺- free PBS and classified as IVM+ or IVM-, as described above. Cumulus-free oocytes were washed with maturation medium and returned to the incubator for a total of 26 hours of incubation.

All oocytes were activated, regardless of their IVM status. Oocytes were washed thrice with H199 medium (TCM-199 with 25 mM HEPES) containing 0.5 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 0.2 mM pyruvate, and 50 µg/mL gentamicin. After washing, oocytes were activated using the same medium supplemented with 5 mM ionomycin for 5 min. After activation, the oocytes were washed thrice with H199 saturated media (TCM-199 with 25 mM Hepes containing 30 mg/mL BSA, 0.2 mM pyruvate, and 10 µg/mL gentamicin) to remove the ionomycin and then washed thrice with synthetic oviduct fluid (SOF) supplemented with 5 mg/mL BSA, 2.5% FCS, 0.2 mM pyruvate, 10 mg/mL gentamicin, and 2 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). Finally, the oocytes were placed in 9 µL single droplets of DMAP-supplemented SOF and incubated at 38.5°C with 5% CO₂ in air for 3 h.

Following activation, oocytes were washed three times with SOF medium supplemented with 5 mg/mL BSA, 2.5% FCS, 0.2 mM pyruvate, and 10 µg/mL gentamicin, and subsequently co-cultured with a monolayer of cumulus cells on the same plate in 9 µL droplets of fresh culture medium covered with mineral oil at 38.5°C in a humid atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂,

and 90% N₂ for 8 days. Embryos were evaluated at D2 (48 h), D7 (168 h), and D8 (192 h) post-activation. This procedure allowed us to classify oocytes and their respective FCs into three groups according to their development competence: the NC group (mature (IVM+) oocytes that were not cleaved after activation), the CNB group (oocytes that were cleaved but subsequently stopped developing), and the BL group (oocytes that completed their development until they reached the blastocyst stage).

RNA and protein extraction

Total RNA, including small RNA molecules, and proteins were extracted using either TRI-reagent or TRI-reagent BD (Molecular Research Center, Inc.), according to the manufacturer's instructions, with some modifications. RNA pellets were dissolved in 10 μ L of RNase-free water. Total RNA was treated with DNase I (Life Technologies) to avoid DNA contamination. RNA concentrations were measured using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) at 260 nm, according to the manufacturer's protocol. Proteins were precipitated from the organic phase remaining after lysis with TRI reagent and dissolved in 20 μ L of an 8 M urea solution before quantification with a Bradford assay (Bio-Rad) according to manufacturer's protocol.

Determination of mRNA and miRNA expression using RT-PCR

Briefly, the reverse transcription reaction was performed with 30 ng of total RNA per gene using a High Capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. PCR amplification was performed with the resulting cDNA using sequence-specific forward and reverse oligonucleotide primers in custom-prepared plates for the indicated genes (Table 1).

Relative quantification of transcripts was performed by qPCR using ABI-7500 (Applied Biosystems) with a denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 95°C for 15 s. A melting curve analysis was performed to ensure the specificity of the products generated. Raw Ct values were normalized to *ACTB*, as previously described for similar tissues [14], to identify the differences among competence groups. Normalized results of quadruplicate samples were used to calculate the relative expression using $2^{-\Delta Ct}$ transformation.

For miRNA-494 and miR-20a, the reverse transcription reaction was performed with 100 ng of total RNA using the miScript PCR Starter Kit (Qiagen, Venlo & Limburg, The Netherlands), according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed using QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands), 10 μ M universal reverse primer (Qiagen, Venlo, Limburg, the Netherlands), 0.1 μ L of cDNA and specific primers: miRNA-494 5' TGAAACATACACGGGAAACCTC 3' and miRNA-20a 5' TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG 3'. Real-time PCR as performed using ABI-7500 (Applied Biosystems). PCR cycling conditions were 95°C for 5 min and 45 cycles of 10 s at 95°C, 55°C for 15 s, and 72°C for 15 s, followed by a melting curve analysis to confirm the uniqueness of the cDNA amplification products. The Ct values of bta-miR-494 and bta-miR-20a, were normalized to the geometric mean of two small reference RNAs (miR-99b and RNU1) and the relative expression was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ transformation. The assays were analyzed in quadruplicate and only Ct values less than 35 were considered.

Target gene validation using a luciferase reporter assay

We constructed a plasmid vector with a fragment of the 3'-UTR harboring the conserved binding sites for bta-miR-494 (wild type construct) or a fragment with mutant variants of the miRNA binding sequences (Mutant construct) inserted between the *SacI* and *XhoI* restriction

Table 1. Bovine primer sequences used in the RT-PCR amplification.

Gene symbol	Primer sequences (5'-3')	Product size	Accession no.	Reference
<i>ACTB</i>	FP: CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC	91	NM_173979.3	[14]
	RP: AACGCAGCTAACAGTCCGCC			
<i>BAX</i>	FP: CCCGAGTTGATCAGGACCAT	153	NM_173894.1	Designed by authors
	RP: CACTCCAGCCACAAAGATGG			
<i>BCL2</i>	FP: CTTTGTGGAGCTGTATGGC	119	NM_001166486.1	Designed by authors
	RP: CCAGATAGGCCACCCAGGG			
<i>BRCA</i>	FP: CTGCATGCCCTGACAGTCCT	132	NM_178573.1	Designed by authors
	RP: CCCCATCGCACGAGTCATCA			
<i>CDK6</i>	FP: CTCGAGGCCCTGGACTTTCT	120	NM_001192301.1	Designed by authors
	RP: GATGCGAGCAAGGCCGAA			
<i>EIF4b</i>	FP: ACGACTCCAGATCTGCACCTG	103	NM_001035028.2	Designed by authors
	RP: TCTTCACCGTCAATGGCGAGA			
<i>EIF4e</i>	FP: TTAATGCTGGCTGTGACTAC	132	NM_174310.3	Designed by authors
	RP: ACGATCGAGGTCACTTCGTCT			
<i>FOXO3a</i>	FP: CGAAGTGGAGCTAGACCCGG	134	NM_001206083.1	Designed by authors
	RP: CGGGGATCATGGAGTCAGCA			
<i>PI3K</i>	FP: ACACAGCTGACGGGACCTTT	127	NM_174575.1	Designed by authors
	RP: CCATATTTCCCATCTCGGTGA			
<i>PTEN</i>	FP: GCCACAAAGTGCCTCGTTTACC	120	XM_613125.6	[15]
	RP: AGAAGGCAACTCTGCCAACAC			
<i>YWHAZ</i>	FP: GCATCCACAGACTATTTCC	120	GU817014.1	Designed by authors
	RP: GCAAAGACAATGACAGACCA			

ACTB—Beta actin; *BAX*—BCL2-associated X protein; *BCL2*—B cell leukemia/lymphoma 2; *BRCA*—Breast cancer 2; *CDK6*—Cyclin-dependent kinase 6; *EIF4b*—Eukaryotic translation initiation factor 4B; *EIF4e*—Eukaryotic translation initiation factor 4E; *FOXO3a*—Forkhead box O3; *PI3K*—Phosphatidylinositol 3-kinase; *PTEN*—Phosphatase and tensin homolog; *YWHAZ*—Tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185045.t001>

sites downstream of pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, USA) to experimentally validate the miRNA-mRNA interaction between bta-miR-494 and the *PTEN* gene. Plasmids were amplified and sequenced to verify the presence and absence of miRNA binding sites in the wild type and mutant constructs, respectively. Ovaries were obtained from local slaughterhouses, and granulosa cells were aspirated from small growing follicles and cultured in 24-well plates as previously described [16]. Sub-confluent cells were co-transfected with either the wild type construct or the mutant construct in the presence or absence of a bta-miR-494 mimic using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, Darmstadt, Germany). After 24 h, treated cells were lysed by adding 75 μ L of 1X passive lysis buffer (PLB) and shaking for 15 min at room temperature. The activities of firefly luciferase and Renilla luciferase were determined using a Dual-Glo luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, USA) by dispensing 20 μ L of the protein lysate followed by 100 μ L of luciferase assay reagent (LAR) and 100 μ L of Stop & Glo reagent. Data were calculated as the ratio of firefly luciferase activity to Renilla luciferase activity and compared with the group transfected with empty vector alone.

Akt protein detection and quantification by western blotting

Samples were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels to detect phosphorylated-Akt (p-Akt) and β -Actin. Proteins were then transferred to a PVDF membrane using Bio-Rad

products and system (Trans-Blot[®] Turbo-Bio-Rad). These membranes were blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich) in TBST (100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, and 50 mM Tris, pH 7.4) for 1 h and incubated with the primary antibody in TBST containing 1% BSA overnight at 4°C. The primary antibody was a p-Akt1/2/3 antibody (Ser 473) (a rabbit polyclonal IgG from Santa Cruz Biotechnology, 1:200 dilution, catalogue number SC-101629), which detects a ~60 kDa protein. Blots were then washed three times with TBST, incubated with an HRP-labelled anti-rabbit IgG (catalogue number #7074S - Cell Signaling Technology) in TBST containing 1% BSA for 1 h at room temperature, and washed another three times with TBST. Finally, blots were washed three times with TBST and incubated with an HRP-labelled mouse monoclonal anti-beta-actin (ACTB) antibody (catalogue number A3854—Sigma-Aldrich) that specifically detects a 43 kDa proteins for 3 h at room temperature to normalize the data. Blots were washed another three times with TBST and treated with Clarity[™] Western ECL substrate (Bio-Rad) to visualize the proteins.

Statistical analyses

Data are displayed as the means $\pm$ SEM of replicate samples. Statistical analyses were performed using the SAS 9.3 software (SAS Institute). ANOVA was performed to assess statistically significant differences, respecting normality and homoscedasticity premises. Means were compared using Duncan's test. When ANOVA premises were not satisfied, data were compared using the Kruskal-Wallis test. Unless stated otherwise, a level of 5% was considered significant.

Results

Individual oocyte competence and developmental rates

One hundred seventy-four oocytes were collected and individually activated. Among these oocytes, 63.79% cleaved and 29.31% reached the blastocyst stage (S1 Table). Only routines in which both blastocyst/cleaved rates were greater than 35% were used in the following experiments.

Analysis of *PTEN* and *PI3K* transcripts and p-Akt protein levels in fcs in relation to oocyte competence

Messenger RNA levels of *PTEN* (a negative effector of the PI3K-Akt pathway) and *PI3K* (a positive effector) were determined in FCs from the NC, CNB, and BL groups. The relative abundance of the *PTEN* mRNA was significantly reduced ($p < 0.05$) in FCs that originated from follicles containing oocytes capable of generating blastocysts *in vitro* compared to FCs that originated from follicles containing oocytes that did not reach this stage (Fig 1A). *PTEN* is responsible for converting PIP3 to PIP2 and maintaining low levels of PIP3, an Akt activator. Although *PI3K* mRNA levels appeared to increase in CNB and BL samples, no significant differences among the oocyte quality groups were detected (Fig 1B). *PI3K* is responsible for converting PIP2 to PIP3 and, therefore, is an important activator of this pathway.

The PI3K-Akt signaling pathway is modulated by the levels of *PTEN* and *PI3K*, which are responsible for Akt activation. We evaluated the levels of the phosphorylated Akt protein (p-Akt) in FCs within the distinct oocyte quality groups to determine the mechanism by which the PI3K-Akt pathway influences oocyte competence. The western blot analysis revealed increased levels of p-Akt ($p < 0.06$) in FCs originating from follicles that generated blastocysts compared to FCs that cleave but interrupt their development after the cleavage (Fig 1C).

Fig 1. Relative expression of (A) *PTEN* and (B) *PI3K* mRNAs in follicular cells according to oocyte competence. (C) Levels of the phosphorylated Akt protein (p-Akt) obtained from western blotting analyses and (D) representative protein bands for p-Akt (~ 60 kDa) and Actin B (ACTB; 42 kDa) from western blotting analyses. Non-cleaved (NC), cleaved non-blastocyst (CNB), blastocyst (BL). Bars depict means and error bars depict standard errors of the means. Differences were statistically significant when $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185045.g001>

MiR-494 and *miR-20a* analysis in fcs in relation to oocyte competence

We investigated the levels of bta-miR-494 and bta-miR-20a, two validated regulators of *PTEN* in humans and bovine, respectively (Liu et al. 2010; Andreas et al. 2016). *PTEN* contains a validated and conserved binding site for miR-494 in many mammalian species, including bovine, according to TargetScan (<http://www.targetscan.org/>). Additionally, bta-miR-20a was recently validated as a regulator of *PTEN* in bovine granulosa cells [13]. Relative levels of bta-miR-494 and bta-miR-20a were significantly higher ($p < 0.05$) in FCs derived from follicles in which the oocytes cleaved, regardless of subsequent blastocyst generation (CNB and BL), than in follicles in which the oocytes did not cleave (NC) (Fig 2A and 2B). Additionally, we performed a luciferase assay to determine whether miR-494 regulated *PTEN* by binding to its 3'UTR. Granulosa cells containing the vector with the wild type copy of the *PTEN* 3'UTR displayed decreased firefly luciferase activity after transfection of the miR-494 mimic compared to the control and mutant construct, suggesting that miR-494 is a validated regulator of *PTEN* (Fig 2C).

Analysis of PI3K-Akt-regulated genes in FCs according to oocyte competence

The PI3K-Akt signaling pathway regulates different cellular effects, including changes in protein synthesis, DNA repair, cell cycle progression, apoptotic signaling etc. We chose to analyze

Fig 2. Relative levels of bta-miR-494 and bta-miR-20a in follicular cells. (A) Relative levels of bta-miR-494 in non-cleaved (NC), cleaved non-blastocyst (CNB), and blastocyst (BL) groups. Bovine miRNA-494 and its validated target *PTEN*. A bioinformatics analysis of the 3'UTR of *PTEN* revealed two conserved target sites among mammals. (B) Relative levels of bta-miR-20a in non-cleaved (NC), cleaved non-blastocyst (CNB), and blastocyst (BL) groups. (C) Luciferase assay of the bovine *PTEN* 3'UTR in granulosa cells. Firefly luciferase activity was evaluated in cells transfected the empty pmirGLO vector, the vector with the wild type *PTEN* 3'UTR insert, and the vector with the mutated insert following the transfection of the bta-miR-494 mimic. Different letters indicate $p < 0.05$. ** indicate $p < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185045.g002>

downstream genes related to different cellular effects using RT-PCR to identify the mechanisms by which PI3K-Akt signaling regulates oocyte competence.

We analyzed the mRNA levels of 8 genes (*BAX*, *BCL2*, *BRCA*, *CDK6*, *EIF4b*, *EIF4e*, *FOXO3a*, and *YWHAZ*) in FCs from the different oocyte competence groups (Fig 3). Among these genes, only the levels of *BAX* and *FOXO3a* showed significant differences between the competence groups. *BAX* levels were increased ($p < 0.05$) in the BL group, although the ratio between *BAX*/*BCL-2* transcript levels did not differ among the groups. Similarly, *FOXO3a*

Fig 3. Relative expression of mRNAs for genes responsible for the downstream cellular effects of PI3K-Akt signaling on non-cleaved (NC), cleaved non-blastocyst (CNB) and blastocyst (BL) groups. Bars depict means and error bars depict standard errors of the means. Different superscripts (a and b) indicate significant differences ($p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185045.g003>

mRNA levels were significantly increased ($p < 0.05$) in the BL and CNB groups compared to the NC group, implying a possible FOXO3a-dependent cell cycle progression response.

Discussion

We dissected ovarian follicles, stored FCs, and individually activated oocytes to evaluate their developmental competences and determine whether components of the PI3K-Akt pathway serve as predictors of oocyte quality. *In vitro* parthenogenetic development allowed us to pool FCs into different groups according to oocyte competences using a retrospective method for subsequent RNA and protein assays. That the main components of the PI3K-Akt signaling pathway displayed different levels of mRNA or protein expression, depending on oocyte

quality. In addition, we investigated genes regulated by PI3K-Akt signaling and observed an increase in *FOXO3a* levels, suggesting the existence of mechanisms governing the modulation of cell-cycle progression, protection against oxidative stress, and the anti-apoptotic response.

Oocyte growth and follicle development rely on the regulation of pathways involved in cell proliferation and survival, such as the PI3K-Akt signaling pathway [17]. The recruitment of primordial follicles is affected by the proliferation of granulosa cells and the regulation of the interaction between the Notch and PI3K-Akt pathways [17, 18]. Follicle loss, maintenance, and growth are strictly controlled by complex molecular interactions, including PI3K-Akt signaling. Stimulation of PI3K promotes Akt phosphorylation, resulting in follicle survival and the induction of growth. Alternatively, this pathway is suppressed by the action of PTEN [18]. PTEN is involved in converting PIP3 to PIP2, and high levels of PTEN are responsible for decreasing the Akt pathway activity, subsequently reducing cell proliferation [17, 19].

In the present study, we detected higher levels of the PTEN mRNA and lower levels of bta-miR-494 and bta-miR-20a, two validated modulators of *PTEN*, in FCs from poor oocyte quality groups, suggesting that the PI3K-Akt signaling pathway is less active in these follicles. The inhibition of PTEN in human ovary *in vitro* results in the increased activation of primordial follicles, but compromises the development of growing follicles [18]. In the murine ovary, the deletion of PTEN in mouse oocytes resulted in pan-ovarian follicle activation and premature oocyte depletion, whereas granulosa cell-specific disruption of PTEN did not affect the initiation of follicle growth, but increased GC proliferation and enhanced ovulation [9, 20]. PTEN was also down-regulated by the up-regulation of miR-494 (a conserved miRNA among mammals) in human bronchial cells, suggesting that this mechanism is important in controlling PTEN levels [21]. Furthermore, we validated the interaction between miR-494 and PTEN using a luciferase assay and the wild-type or mutant 3'UTR. As predicted by the bioinformatics analysis, binding of bta-miR-494 to the wild-type 3'UTR sequence reduced the levels of luciferase activity compared to the control and the PTEN mutant sequence. Therefore, bta-miR-494 regulates the levels of *PTEN* in follicular cells. Similar analysis were performed for bta-miR-20a, which was validated as a regulator of *PTEN* in granulosa cells [13]. Thus, *PTEN* levels are regulated by the increase in miR-494 and miR-20a expression in follicles harboring competent oocytes. Additionally, multiple miRNAs regulating the same mRNA target are necessary required to induce a physiological response, such as upregulation of Akt, which was observed in cells obtained from follicles associated with higher quality oocytes.

Follicular cells from follicles harboring incompetent oocytes have a molecular profile marked by an increase in *PTEN* expression and lower expression of bta-miR-494 and bta-miR20a, which indicates lower activity of the PI3K-Akt pathway. In contrast, the competent group display different levels of these indicators, confirming the increased activity of the PI3K-Akt pathway in this group. These two molecular profiles are associated with oocyte competence, and based on previously described functions of the PI3K-Akt pathway in follicular environments, we postulate that these differences in oocyte competence are related to the regulation of cell proliferation, protection from oxidative stress, and inhibition of apoptosis in the FCs, as discussed below.

In addition to its involvement in cell proliferation and survival, the PI3K-Akt signaling pathway plays roles in apoptosis, protein synthesis, the cell cycle, angiogenesis, DNA repair, and metabolic pathways, as reviewed in a previous publication [22]. In the present study, we analyzed the mRNA levels of genes related to different cellular processes, such as *BAX*, *BCL-2* (apoptosis), *BRCA* (DNA repair), *EIF4b*, *EIF4e* (protein synthesis), *FOXO3a*, *YWHAZ* (cell cycle progression), and *CDK6* (FOXO-independent cell cycle progression) to identify the intracellular events that mediate the relationship between the PI3K-Akt signaling pathway and the ability of the oocyte to develop into a blastocyst. We observed differences in the levels of

the *FOXO3a* and *BAX* transcripts between FC groups, which were associated with different oocyte capacities to develop into blastocysts.

Here, *FOXO3a* levels were increased in FCs of higher quality oocytes. The transcription factor *FOXO3a* plays an important role in ovarian activity [23], and, when activated, it has broad anti-proliferative and pro-apoptotic cellular effects. In addition to these effects, *FOXO3a* protects quiescent cells from oxidative stress [24]. Moreover, *FOXO3a* has also been reported to protect mouse oocytes from oxidative stress [25]. The effects induced by increased *FOXO3a* expression may also vary, depending on the signal integration and associated factors, and may range from triggering cell death to promoting survival by inducing the expression of oxidative stress resistance factors [26]. Since this study does not include assessments of other factors involved in regulating *FOXO3a* levels, with the exception of the p-Akt protein and *FOXO3a* levels, we cannot specifically identify the final effects associated with *FOXO3a* in FCs. However, since different levels of *FOXO3a* were detected in FCs from different oocyte competence groups, we propose that the Akt-*FOXO3a* interaction functions to adjust the regulation of the oxidative stress response and cell proliferation and leads to apoptosis by either favoring or preventing the acquisition of competence. We also hypothesize that in the BL group, the Akt-*FOXO3a* interaction promotes the transcription of *FOXO3a* (since it acts as an enhancer for its own transcription), which then contributes to the regulation of ROS scavengers. Moreover, Akt, which inhibits *FOXO3a*, allows a final proliferative and anti-apoptotic response in high competence follicles.

Another gene that displayed differences in expression levels among the developmental competence groups was *BAX*, which was increased in the higher quality group. *BCL2* and *BAX* are anti-apoptotic and pro-apoptotic genes, respectively, and serve as markers of apoptosis in ovarian tissues [27]. Oocyte competence may be related to events linked to apoptosis, and early apoptosis signals in the oocyte [28] or in GCs [29] are positively correlated with oocyte competence, suggesting the involvement of apoptotic processes in follicular and oocyte development. The pro-apoptotic or anti-apoptotic effects of *BCL-2* and *BAX* genes depend on protein-protein interactions. The *BAX* protein forms homodimers or heterodimers with *BCL-2*. The increase in the proportion of *BAX* homodimers in relation to *BAX*-*BCL-2* heterodimers determines the triggering of cell death through apoptosis. Thus, the *BAX/BCL-2* ratio is the main indicator of the apoptotic process [30, 31]. In this study, the *BAX/BCL-2* ratios were not significantly different among oocyte quality groups, and therefore, we do not have clear evidence that this ratio regulates the acquisition of oocyte competence, as previously suggested by Yang and collaborators [32]. The homodimerization of *BAX* and its translocation to the mitochondria to trigger apoptosis is directly regulated by the p-Akt protein [33]. The p-Akt protein phosphorylates the *BAX* protein and regulates its activity; thus, *BAX* phosphorylation prevents its translocation to the mitochondria and induces its maintenance in the cytoplasm as a heterodimer with *BCL-2*, preventing apoptosis. In the results described in this study, the BL group, in addition to displaying higher *BAX* levels, also displayed elevated p-Akt level. Therefore, in these cells, the elevation of the *BAX* mRNA did not lead to a higher incidence of apoptosis, due to its low activity resulting from the phosphorylation induced by p-Akt. Furthermore, in the CNB group, *BAX* expression, but not p-Akt, is elevated in the FCs, potentially suggesting a higher probability of apoptosis, even if the *BAX/BCL-2* ratio does not increase. Finally, p-Akt also helps control apoptosis by regulating *BCL-2* availability. *BCL-2* and its associated death promoter (*BAD*) form heterodimers, precluding *BCL-2* from forming heterodimers with *BAX*. Phosphorylation of *BAD* by p-Akt leads to the isolation of *BAD* by the 14-3-3 protein family and a subsequent anti-apoptotic effect [34]. Therefore, p-Akt, acting by either phosphorylating and sequestering *BAD* or by phosphorylating *BAX* and inducing its localization in the cytoplasm, triggers the anti-apoptotic response within cells.

Fig 4. Schematic representation of the PI3K-Akt signaling pathway model and cellular responses in ovarian follicular cells (FCs) associated with competent oocytes that were able to reach the blastocyst stage (BL) and incompetent oocytes that were unable to initiate embryo development after maturation (NC). Pentagons indicate whether a given component of the pathway was upregulated (upward arrow) or downregulated (downward arrow) in FCs from the BL and NC groups. Lines ending in arrowheads indicate stimulation, whereas lines ending in bars indicate blockage.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185045.g004>

The mechanisms involved in the acquisition of oocyte competence have not yet been completely elucidated. The acquisition of oocyte competence is a multifactorial process, and although some basic processes are well known, such as the progression of meiosis and migration of cortical granules, some intracellular processes and molecular events that lead to the formation of an oocyte capable of supporting development are still unclear. Several factors influence oocyte quality and regulate competence acquisition. However, an adequate follicular microenvironment is a key factor in successful follicle growth and oocyte competence acquisition. In conclusion, using a retrospective developmental competence model, we investigated whether the PI3K-Akt pathway was associated with oocyte quality. This model allowed us to compare the molecular profiles of components of the PI3K-Akt signaling pathway in FCs with oocyte competence levels ranging from development to the blastocyst stage. We were able to identify a molecular landscape formed by the PI3K-Akt pathway in FCs consisting of lower *PTEN*, *FOXO3a*, *bta-mir-494*, *bta-mir-20a*, and *BAX* levels, leading to high oocyte developmental potential (Fig 4). This molecular landscape is compatible with cellular responses related to protection against oxidative stress, cell proliferation, and inhibition of apoptosis, suggesting

that these PI3K-Akt-induced cellular responses contribute to oocyte competence acquisition during oogenesis.

Supporting information

S1 Table. Routines for individual parthenogenetic bovine embryo development displaying blastocyst/cleaved rates greater than 35%. (DOCX)

Acknowledgments

The authors like to thank the staff and students at the Laboratory of Molecular Morphophysiology and Development (LMMD) for all their help with the sample collections and laboratory procedures. This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP grants 2014/21034-3; 2014/22887-0; 2013/08135-2 and 2012/50533-2) and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Gabriella Mamede Andrade, Juliano Coelho da Silveira, Flávio Vieira Meirelles, Felipe Perecin.

Formal analysis: Gabriella Mamede Andrade, Juliano Coelho da Silveira, Samuel Gebremedhn, Dawit Tesfaye, Felipe Perecin.

Funding acquisition: Juliano Coelho da Silveira, Dawit Tesfaye, Flávio Vieira Meirelles, Felipe Perecin.

Investigation: Gabriella Mamede Andrade, Claudia Perrini, Maite Del Collado, Samuel Gebremedhn.

Methodology: Gabriella Mamede Andrade, Juliano Coelho da Silveira, Dawit Tesfaye, Flávio Vieira Meirelles, Felipe Perecin.

Project administration: Juliano Coelho da Silveira, Dawit Tesfaye, Flávio Vieira Meirelles, Felipe Perecin.

Resources: Juliano Coelho da Silveira, Dawit Tesfaye, Flávio Vieira Meirelles, Felipe Perecin.

Supervision: Juliano Coelho da Silveira, Felipe Perecin.

Validation: Juliano Coelho da Silveira, Dawit Tesfaye, Felipe Perecin.

Visualization: Gabriella Mamede Andrade, Juliano Coelho da Silveira, Samuel Gebremedhn, Dawit Tesfaye, Felipe Perecin.

Writing – original draft: Gabriella Mamede Andrade, Juliano Coelho da Silveira, Felipe Perecin.

Writing – review & editing: Gabriella Mamede Andrade, Juliano Coelho da Silveira, Claudia Perrini, Maite Del Collado, Samuel Gebremedhn, Dawit Tesfaye, Flávio Vieira Meirelles, Felipe Perecin.

References

1. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals*. 2003; 38(4):259–67. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x> PMID: 12887565
2. Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, Robert C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction*. 2003; 117–29. PMID: 14635931
3. Mermillod P, Dalbies-Tran R, Uzbekova S, Thelie A, Traverso JM, Perreau C, et al. Factors affecting oocyte quality: Who is driving the follicle? *Reproduction in Domestic Animals*. 2008; 43:393–400. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01190.x> PMID: 18638152
4. Krisher RL. In Vivo and In Vitro Environmental Effects on Mammalian Oocyte Quality. *Annual Review of Animal Biosciences*, Vol 1. 2013; 1:393–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103647> PMID: 25387025
5. Combelles CMH, Hollick EA, Paoletta LJ, Walker DC, Wu QQ. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. *Reproduction*. 2010; 139(5):871–81. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0390> PMID: 20197373
6. Sirard MA, Assidi M. Screening for Oocyte Competence. *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals*. 2013:191–206.
7. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*. 2008; 14(2):159–77. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040> PMID: 18175787
8. Adhikari D, Liu K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. *Endocrine Reviews*. 2009; 30(5):438–64. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0048> PMID: 19589950
9. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*. 2008; 319(5863):611–3. <https://doi.org/10.1126/science.1152257> PMID: 18239123
10. Makker A, Goel MM, Mahdi AA. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2014; 53(3):R103–R118. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0220> PMID: 25312969
11. Xu M, Mo YY. The Akt-associated microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012; 69(21):3601–12. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1129-8> PMID: 22936352
12. Luo X, Dong Z, Chen Y, Yang L, Lai D. Enrichment of ovarian cancer stem-like cells is associated with epithelial to mesenchymal transition through an miRNA-activated AKT pathway. *Cell Proliferation*. 2013; 46(4):436–46. <https://doi.org/10.1111/cpr.12038> PMID: 23869765
13. Andreas E, Hoelker M, Neuhoef C, Tholen E, Schellander K, Tesfaye D, et al. MicroRNA 17–92 cluster regulates proliferation and differentiation of bovine granulosa cells by targeting PTEN and BMPR2 genes. *Cell and Tissue Research*. 2016:1–12.
14. Sangalli JR, Chiaratti MR, De Bem THC, de Araujo RR, Bressan FF, Sampaio RV, et al. Development to Term of Cloned Cattle Derived from Donor Cells Treated with Valproic Acid. *Plos One*. 2014; 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101022> PMID: 24959750
15. Sharma I, Singh D. Conjugated linoleic acids attenuate FSH-and IGF1-stimulated cell proliferation; IGF1, GATA4, and aromatase expression; and estradiol-17 β production in buffalo granulosa cells involving PPAR γ , PTEN, and PI3K/Akt. *Reproduction*. 2012; 144(3):373–83. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0079> PMID: 22733801
16. Gebremedhn S, Sailew-Wondim D, Hoelker M, Rings F, Neuhoef C, Tholen E, et al. MicroRNA-183-96-182 Cluster Regulates Bovine Granulosa Cell Proliferation and Cell Cycle Transition by Coordinately Targeting FOXO1. *Biology of Reproduction*. 2016; 94(6). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137539> PMID: 27122636
17. Wang L-Q, Liu J-C, Chen C-L, Cheng S-F, Sun X-F, Zhao Y, et al. Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between the Notch and phosphatase and tensin homologue (PTEN)/AKT pathways. *Reproduction, Fertility and Development*. 2014.
18. McLaughlin M, Kinnell HL, Anderson RA, Telfer EE. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Molecular Human Reproduction*. 2014; 20(8):736–44. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau037> PMID: 24830779
19. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(22):13375–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13375> PMID: 9593664

20. Fan HY, Liu ZL, Cahill N, Richards JS. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Molecular Endocrinology*. 2008; 22(9):2128–40. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0095> PMID: 18606860
21. Liu LH, Jiang YG, Zhang HY, Greenlee AR, Han ZY. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Life Sciences*. 2010; 86(5–6):192–8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.002> PMID: 20006626
22. Lai K, Killingsworth M, Lee C. Gene of the month: PIK3CA. *Journal of clinical pathology*. 2015; 68(4):253–7. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202885> PMID: 25688137
23. Brenkman AB, Burgering BMT. FoxO3a eggs on fertility and aging. *Trends in Molecular Medicine*. 2003; 9(11):464–7. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2003.09.003> PMID: 14604822
24. Kops G, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KWA, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002; 419(6904):316–21. <https://doi.org/10.1038/nature01036> PMID: 12239572
25. Di Emidio G, Falone S, Vitti M, D'Alessandro AM, Vento M, Di Pietro C, et al. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human Reproduction*. 2014; 29(9):2006–17. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu160> PMID: 24963165
26. Neri C. Role and therapeutic potential of the pro-longevity factor FOXO and its regulators in neurodegenerative disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2012; 3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00015> PMID: 22363285
27. Driancourt MA, Thuel B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reproduction Nutrition Development*. 1998; 38(4):345–62. <https://doi.org/10.1051/rd:19980401>
28. Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ, et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2009; 114(1–3):89–98. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.018> PMID: 19008057
29. Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, et al. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*. 2007; 67(8):1339–50. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.017> PMID: 17420040
30. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001; 117(2):333–40. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01409.x> PMID: 11511312
31. Marx D, Binder C, Meden H, Lenthe T, Ziemek T, Hiddemann T, et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Research*. 1997; 17(3C):2233–40. PMID: 9216694
32. Yang MY, Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science*. 2002; 70(3–4):159–69. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00186-5) PMID: 11943486
33. Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, et al. $\times$ Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt Regulates Its Activity and Apoptosis in Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(20):21085–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400063200> PMID: 14766748
34. Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, et al. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(15):10761–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10761> PMID: 10753867